Lehrstuhl für Experimentelle Zahnheilkunde

Vorstand: Prof. Dr. Günther Siebert
an der Klinik und Poliklinik
für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der Universität Würzburg

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE TAXONOMIE VON XYLIT ABBAUENDEN ZAHNPLAQUEKEIMEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Günter H i n k e l
aus Eppertshausen

Würzburg, 04. Mai 1981

Lehrstuhl für Experimentelle Zahnheilkunde

Vorstand: Prof. Dr. Günther Siebert
an der Klinik und Poliklinik
für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der Universität Würzburg

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE TAXONOMIE VON XYLIT ABBAUENDEN ZAHNPLAQUEKEIMEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Günter H i n k e l
aus Eppertshausen

Würzburg, 04. Mai 1981

Referent:	Prof. Dr. F. G e h r i n g
Korreferent:	Prof. Dr. R. N a u j o k s
Dekan:	Prof. Dr. K.-H. W u l f

Tag der mündlichen Prüfung: 16.6.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	EINLEITUNG UND LITERATURÜBERSICHT	1
2.	PROBLEMSTELLUNG	8
3.	MATERIAL UND METHODEN	9
3.1	Bakterienstämme	9
3.2	Nährböden und Methoden zur Identifizierung der Keime	9
3.2.1	Bakterienanzucht	9
3.2.2	Methoden zur allgemeinen physiologischen Diagnostik	10
3.2.3	Differentialmethoden zur Charakterisierung und Identifizierung der xylitabbauenden Keime	12
3.2.4	Methoden zur Gruppierung nach morphologischen Hauptmerkmalen	28
4.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	29
4.1	Allgemeine Gruppierung nach Hauptmerkmalen	29
4.1.1	Morphologische Charakterisierung	29
4.1.2	Gruppierung nach physiologischen Hauptmerkmalen	32
4.1.3	Auswertung der Ergebnisse	34
4.2	Charakterisierung und Identifizierung der Streptokokken	42
4.2.1	Einteilung der untersuchten Streptokokkenstämme in fünf Biotypen	51
4.2.2	Charakterisierung der Streptokokkenstämme	55
4.2.3	Identifizierung der Streptokokkenstämme	58
4.3	Charakterisierung und Identifizierung des Stammes RX2	64

		Seite
4.3.1	Charakterisierung des Stammes RX2	64
4.3.2	Identifizierung des Stammes RX2	66
4.4	Charakterisierung und Differenzierung des Stammes HX1	73
4.4.1	Charakterisierung des Stammes HX1	73
4.4.2	Differenzierung des Stammes HX1	76
5.	ZUSAMMENFASSUNG	88
6.	LITERATURVERZEICHNIS	90

1. EINLEITUNG UND LITERATURÜBERSICHT

Die Zahnerkrankungen weisen gegenwärtig in den hochzivilisierten Ländern mit Abstand die höchste Morbiditätsquote beim Menschen auf (BINDER 1979, SAUERWEIN 1974). Etwa 95% unserer Bundesbürger sind von der "Volksseuche" Karies befallen. Laut Sozialbericht der Bundesregierung erreichten die Kosten für die Behandlung der Karies und ihrer Folgen im Jahre 1977 fast die 10-Milliarden-Grenze (NEUMEISTER 1979).

Einer der wesentlichen kariesätiologischen Momente ist nach den heutigen Erkenntnissen die mikrobielle Plaque (RÖLLA 1976) - ein fest auf der Zahnoberfläche haftender Belag aus Mikroorganismen, Speichelbestandteilen und Nahrungsresten (BÖSSMANN 1979). Der Kariesprozeß nimmt hier durch die Stoffwechselaktivitäten der Plaquemischflora seinen unmittelbaren Ausgang (GEHRING 1979). Neben einer Vielzahl unterschiedlicher biochemischer Prozesse, die dabei in dem Biotop Zahnplaque ablaufen, steht hinsichtlich der Entstehung von Zahnkaries der Kohlenhydratstoffwechsel im Vordergrund. Hier wiederum die Bildung saurer Abbauprodukte in Form verschiedener organischer Säuren, sowie die Synthese intra- und extrazellulärer Polysaccharide (BÖSSMANN 1979, GEHRING 1979).

Wie aus zahlreichen Untersuchungsergebnissen der mikrobiologischen Kariesforschung hervorgeht sind die Streptokokken der Plaque in besonderem Maße an diesem Stoffwechselgeschehen beteiligt (RANKE 1970, BRAMSTEDT et al. 1971, GEHRING 1979, BÖSSMANN 1979). "Sie werden als hauptverantwortlich für die Entstehung des Kariesprozesses angesehen" (GEHRING et al. 1971, 1972), und zwar aus folgenden Gründen:

1) Keimarten der Gattung Streptococcus stellen nach Angaben verschiedener Autoren den überwiegenden Anteil am Gesamtvorkommen der kariesätiologisch

relevanten Mikroflora der Zahnplaque (RANKE 1970, GEHRING et al. 1971, 1972, 1979, BÖSSMANN 1979).

Die wichtigsten Vertreter dieser Mikroorganismen in den Plaques sind nach GEHRING (1979) die Arten S. mutans, S. sanguis und S. mitis, während S. salivarius und S. milleri dort weniger häufig auftreten.

2) Viele Arten der Plaquestreptokokken zeichnen sich durch eine besonders rasche und intensive schmelzschädigende Säurebildung aus Nahrungskohlenhydraten aus (RANKE 1970,GEHRING 1979).

Da die engmaschige Textur der Beläge für hochmolekulare Kohlenhydrate, wie Stärke oder Glykogen, als Diffusionsbarriere wirkt, sind sie dem mikrobiellen Abbau in den tieferen Plaqueschichten praktisch nicht zugänglich (MÜHLEMANN 1969, SAUERWEIN 1974). Die Kariogenität der Polysaccharide wird daher als gering bewertet (BRAMSTEDT 1965, MÜHLEMANN 1969, SAUERWEIN 1974).

Nur die niedermolekularen Kohlenhydrate, die Mono- und Disaccharide, penetrieren schnell und tief in die Plaque (GEHRING 1972, MÄKINEN 1972, TRAUTNER 1974) und werden von den überwiegend homofermentativen Plaquestreptokokken vor allem zu der stark aziden Milchsäure (ELIAS 1976), aber auch zu schwächeren organischen Säuren abgebaut (RANKE et al. 1964, BÖSSMANN 1979). Diese sauren Metabolite können bereits wenige Minuten nach der Nahrungsaufnahme zu einer Senkung des pH-Wertes in den Belägen von ca. 7 auf 4 bis 5 führen FROSTELL et al. 1979). Die kritische Grenze, bei der die Auflösung der Kalziumsalze im Zahnschmelz beginnt, wird allgemein mit einem pH-Wert zwischen 5,0 und 5,5 angegeben (MÜHLEMANN 1969, FROSTELL et al. 1979, BÖSSMANN 1979). Da die Pufferkapazität des Plaquesystems nicht ausreicht, den Säureüberschuß zu neutralisieren, können die Wasserstoffionen der gebildeten Säuren

in den Schmelz diffundieren und dort Kalzium- und Phosphorionen herauslösen: die kariöse Initialläsion entsteht (SAUERWEIN 1974, BÖSSMANN 1979).

3) Neben einigen anderen Mikroorganismen der Plaqueflora können viele Streptokokkenarten bei reichlicher Zufuhr niedermolekularer Kohlenhydrate glykogenähnliche, intrazelluläre Polysaccharide bilden (RANKE 1970, GEHRING 1979).

Die Bedeutung dieser intrazellulären Hochpolymeren für die Kariesentstehung ist darin zu sehen, daß sie von den Mikroorganismen als Reservesubstanzen in den Zellen abgelagert und dann bei Substratmangel, beispielsweise während der Nachtstunden, wieder mobilisiert und unter kontinuierlicher Säurebildung abgebaut werden (van HOUTE 1964, BERMANN and GIBBONS 1966, RANKE 1970, RANKE et al. 1974, GEHRING 1979).

4) Mehrere Streptokokkenarten, die dem Formenkreis Streptococcus mutans angehören, synthetisieren aus Saccharose dextranähnliche, extrazelluläre Polysaccharide von klebriger Konsistenz (MÜHLEMANN 1969, RANKE 1970, RANKE et al. 1974, GEHRING 1978, 1979).

Die Bildung extrazellulärer Polysaccharide ist ein wesentliches Merkmal der Kariogenität oraler Bakterienspezies, da nur die so befähigten Mikroorganismen in der Lage sind, Plaques zu bilden (BÖSSMANN 1979). Unter diesem Gesichtspunkt nehmen S. mutans, ebenso wie die Saccharose, eine beachtliche Sonderstellung in der modernen Kariesätiologie ein.

Die von S. mutans ausschließlich nach Überangebot von Saccharose erzeugten hochmolekularen Glucosepolymere bilden zusammen mit Speichelkomponenten unlösliche, fest auf der Zahnoberfläche haftende Komplexe (RANKE 1970, SAUERWEIN 1974),

die als Matrix dienen für die Adsorption und das Wachstum kariogener Mikroorganismen. Der Aufbau voluminöser Plaques wird dadurch entscheidend gefördert.
Insbesondere ermöglichen die auf dem Zahnschmelz abgeschiedenen, klebrigen Polysaccharide vielen Keimarten der oralen Mikroflora, sich über die Prädilektionsstellen hinaus auch auf Zahnglattflächen zu etablieren und dort mit der Bildung von Plaque Glattflächenkaries zu induzieren (RANKE et al. 1970). So gilt S. mutans, der neben den genannten Plaquefördernden Eigenschaften eine ausgesprochen starke Milchsäurebildung aufweist, heute als die am stärksten kariogene Keimart (RANKE 1970, HAHN et al. 1973, GEHRING 1972, 1973, 1979).

Die Saccharose (Rohrzucker, Rübenzucker) ist als einziges Substrat für die Synthese extrazellulärer Polysaccharide geeignet (MÜHLEMANN 1969, GEHRING 1979), was offensichtlich mit der hohen Hydrolyseenergie zwischen den beiden Monosaccharidanteilen, der Glucose und Fructose, im Zusammenhang steht (MÄKINEN 1972). Sie ist damit ein wichtiger Faktor bei der Plaquebildung und erweist sich, auch im Hinblick auf die gute bakterielle Vergärbarkeit (MÜHLEMANN 1969), eindeutig als Zucker mit der höchsten Kariogenität (NEWBRUN 1967, WINTER 1968, MÜHLEMANN 1969, KÖNIG 1971, MÄKINEN 1972). Zudem findet die Saccharose als eigentlicher Haushalts- und Gebrauchszukker viel häufiger Verwendung als andere Zuckerarten (MÜHLEMANN 1969, GEHRING 1979).

Im Rahmen einer gezielten Kariesprophylaxe ist man daher seit längerem bemüht, neben der Anwendung von Fluoriden und einer Intensivierung der Mund- bzw. Zahnhygiene, die Saccharose vor allem in Süßwaren durch sogenannte Saccharose-Austauschstoffe mit fehlender oder doch deutlich verminderter Kariogenität zu ersetzen (MÄKINEN 1972, NEWBRUN 1973, GÜLZOW 1974, 1977, GEHRING u. KARLE 1975, GEHRING 1973, 1979).-
Zur näheren Erläuterung dieser Stoffgruppe muß zunächst grundsätzlich zwischen kalorienhaltigen Saccharose-Austausch-

stoffen und Zuckerersatzstoffen ohne Energiewert unterschieden werden. Bei letzteren handelt es sich um natürliche (Monellin, Aspartame) und synthetische (Saccharin, Cyclamat), bakteriell nicht verwertbare Süßstoffe, die vorwiegend zum Süßen von Getränken verwendet werden. Der Einsatz dieser Substanzen in der Kariesprävention ist damit begrenzt (GEHRING 1979, FROSTELL et al. 1979).

Zu den kalorischen Saccharose-Austauschstoffen zählen in erster Linie die Zuckeralkohole (Hexite, Pentite), unter denen es eine Reihe von Substanzen gibt, die zuckerähnliche, süßschmeckende Stoffe mit Energiewert darstellen (GEHRING 1979), von den Mikroorganismen der Plaque aber, wenn überhaupt, deutlich verzögert und mit einem erheblich verminderten Säurepotential abgebaut werden (DALLMEIER et al. 1970, STEGMEIER et al. 1971, GÜLZOW 1971, 1974, GEHRING und GÜLZOW 1977, GEHRING 1974, 1977, 1979, FROSTELL et al. 1979).

Einer der aktuellen Saccharose-Austauschstoffe ist der fünfwertige Zuckeralkohol Xylit (GÜLZOW 1977). Diese Verbindung ist ein natürlicher Bestandteil verschiedener Früchte und Gemüse und wird mit der Nahrung vom menschlichen Organismus aufgenommen und verwertet. Seine großtechnische Herstellung erfolgt seit 1974 in Finnland aus dem Holzzucker (Xylan) der Birke über die Hydrolyse zu d-Xylose und Hydrierung zum Endprodukt (GEHRING 1979).

Zahlreiche tierexperimentelle und mikrobiologische Untersuchungen der letzten Jahre zeigen die außerordentlich geringe oder sogar völlig fehlende Kariogenität des Xylit und machen zugleich seine Überlegenheit gegenüber anderen Saccharose-Austauschstoffen, z.B. Sorbit und Mannit, besonders deutlich (MÜHLEMANN et al. 1970, KARLE und BÜTTNER 1971, GEHRING 1971, 1974, GRUNBERG et al. 1973, KARLE und GEHRING 1975, 1976, KNUUTTILA und MÄKINEN 1975, KARLE 1977).

In einem klinischen Langzeitversuch, der am zahnärztlichen Institut der Universität Turku, Finnland, über einen Zeitraum von zwei Jahren durchgeführt wurde, sollte festgestellt werden, ob sich der Xylit als Saccharose-Austauschstoff für den Einsatz in der Kariesprophylaxe eignet. An diesen Turku-Zuckerstudien (SCHEININ und MÄKINEN 1975) nahmen über 100 Probanden teil, die in drei Gruppen eingeteilt waren und während der gesamten Versuchsdauer praktisch ausschließlich mit Saccharose, Fructose oder Xylit gesüßte Nahrungsmittel erhielten. Das wichtigste klinische Resultat ergab nach Ablauf der Diätstudie einen höchst signifikant verminderten Karieszuwachs um etwa 90% bei den Xylit-Probanden im Vergleich zur Saccharose- bzw. Fructose-Versuchsgruppe (SCHEININ et al. 1974). Bei langfristigem Gebrauch von Xylit war außerdem eine erhebliche Reduktion des Plaquewachstums zu verzeichnen (MÄKINEN und SCHEININ 1974, SCHEININ und MÄKINEN 1977, GEHRING 1979).

Die im Rahmen der Turku-Zuckerstudien durchgeführten mikrobiologischen Untersuchungen (GEHRING et al. 1975) zeigten ferner, daß die kariogene S. mutans-Art in der Xylit-Gruppe weitaus weniger häufig vorkam als in der Saccharose- bzw. Fructose-Gruppe, was erneut die Bedeutung dieser Keimart für den Kariesprozess unterstreicht (GEHRING 1978). Der festgestellte, stark reduzierte Karieszuwachs bei den Xylit-Probanden (SCHEININ und MÄKINEN 1975), ist aus mikrobiologischer Sicht vor allem auf das stark verringerte Säurepotential in den Plaques dieser Versuchsgruppe zurückzuführen. Xylit wird nämlich weder von den potentiell kariogenen Streptoccus mutans-Varianten noch von der Masse der übrigen Plaquemikroorganismen unter Säurebildung verwertet (GEHRING und GÜLZOW 1977, GEHRING 1977, 1978). Auch ergaben sich für eine zunächst vermutete Anpassung der Plaqueflora in der Xylit-Gruppe, mit der Folge verstärkten mikrobiellen Xylit-Abbaues, selbst am Ende der zweijährigen Versuchszeit, keine Anhaltspunkte (GEHRING et al. 1975, GEHRING 1976b, 1978, GEHRING

und GÜLZOW 1977). Nur sporadisch konnten aus wenigen Plaqueproben aller drei Versuchsgruppen xylitabbauende Bakterienstämme isoliert werden, die zunächst als serologisch nicht eingruppierbare Streptokokken diagnostiziert wurden (GEHRING et al. 1975). Ähnliche Streptokokken ließen sich auch in der Mundhöhle von Ratten nachweisen (GEHRING 1974). Da der Xylitabbau solcher Stämme aber äußerst langsam und unter sehr schwacher Säurebildung erfolgt (GEHRING 1976b, 1977, GEHRING et al. 1975, GEHRING und GÜLZOW 1977), dürfte dieser für das Kariesgeschehen praktisch ohne Bedeutung sein (GEHRING 1974, KARLE und GEHRING 1975). Diese Aussage wird wesentlich gestützt durch Kariogenitätsuntersuchungen an keimfreien Ratten, bei denen sich sowohl die aus Zahnplaque des Menschen als auch der Ratte isolierten xylitabbauenden Streptokokken als nicht kariogen erwiesen (KARLE und GEHRING 1976).

2. PROBLEMSTELLUNG

"Kein bisher bekannter Saccarose-Austauschstoff ist dem mikrobiellen Angriff der Plaque- und Speichelflora bzw. einzelnen Vertretern dieser Mischflora gegenüber derart widerstandsfähig wie Xylit" (GEHRING 1979). Nur sehr wenige Keime besitzen die Fähigkeit den Xylit unter Säurebildung zu verwerten. GEHRING ist es gelungen, solche Keime aus Zahnplaque des Menschen sowie aus der Mundhöhle der Versuchstiere Ratte und Hamster zu isolieren (GEHRING 1974, GEHRING et al. 1975).

In der vorliegenden Arbeit sollen die von GEHRING isolierten, xylitabbauenden Bakterienstämme bakteriologisch näher charakterisiert, differenziert und taxonomisch eingeordnet werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Bakterienstämme

Gegenstand der Untersuchungen waren insgesamt 26 xylitabbauende Bakterienstämme, die von GEHRING (1974) aus der Mundhöhle der Versuchstiere Ratte und Hamster sowie (1975) im Verlauf der Turku-Zuckerstudien aus Zahnplaques des Menschen isoliert und in Reinkultur gewonnen wurden.

Entsprechend ihrer Fähigkeit Xylit zu verwerten wurden die betreffenden Stämme mit X = Xylitabbauer gekennzeichnet und nach ihrer Herkunft mit R = Ratten, H = Hamster und T= Turku-Zuckerstudien (Mensch) weiter unterschieden und fortlaufend numeriert. Im einzelnen handelte es sich um folgende Bakterienstämme:

RX1, RX2, RX3, RX4, RX5, RX6, RX7, RX8, RX9, RX10, RX11, RX12, RX13;

HX1;

T1X40, T1X43, T1X94;
T2X1, T2X103;
T5X99, T5X100, T5X102, T5X118, T5X119, T5X120, T5X122;

3.2 Nährböden und Methoden zur Identifizierung der Keime

3.2.1 Bakterienanzucht

Für die laufenden Versuche wurden die Bakterienstämme in Stichkulturen gehalten und bei 4° C aufbewahrt. Als fester Nährboden diente Bacto Phenol Red Agar Base (Difco 0098-01) mit einem Zusatz von 1% Xylit. Die Anzucht der Bakterien erfolgte in Bacto-NIH-Thioglycollate-Broth (Difco 0257-01) mit einem Zusatz von 0,5% Glucose.

Die Keime wurden aus den Stichkulturen mit einer sterilen Impfnadel in das flüssige Thioglycollate-Nährmedium überimpft und anschließend 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Danach stand eine ausreichende Bakterienmenge zur Verfügung. Zur Kontrolle der Reinheit der Bakteriensuspension wurden die Keime auf festen Phenol Red Agar Base (Difco) - Nährboden, mit 1% Xylitzusatz, überimpft und die Platten 24 Stunden bei 37° C aerob bzw. anaerob (BBL-Gas-Pak-System) bebrütet. Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop. Dieses Kontrollverfahren gab zugleich Aufschluß über das Wachstumsverhalten der einzelnen Stämme unter aeroben und anaeroben Bedingungen. Die Stichkulturen wurden nach jedem Überimpfen - spätestens nach 4 Wochen - neu angelegt. Alle Arbeitsgänge wurden nach den in der Bakteriologie erforderlichen, sterilen Kautelen durchgeführt.

3.2.2 Methoden zur allgemeinen physiologischen Diagnostik

a) Katalase Test

Prinzip: Katalasen sind Enzyme, die das als oxidatives Endprodukt des aeroben Kohlenhydratstoffwechsels anfallende und für Bakterien toxische Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff spalten und damit eliminieren (MAC FADDIN 1976). Geprüft wurde in diesem Test die Fähigkeit der Keime das Enzym Katalase zu bilden.

Testmedium: Phenol Red Agar Base (Difco) + 5% Saccharose

Anwendung und Auswertung: Die Keime wurden mit sterilen Ösen aus den Thioglycollate-Vorkulturen auf die Platten überimpft und bei 37° C aerob bebrütet. Der Katalasenachweis erfolgte nach 2 Tagen durch Auftropfen einer 10%-igen H_2O_2-Lösung auf die Kolonien. Eine positive Reaktion ist an der heftigen Sauerstoffentwicklung (Blasenbildung) zu erkennen.

b) Oxidase Test

Prinzip: Geprüft wurde die Fähigkeit der Bakterien Oxidasen, Enzyme des aeroben Stoffwechsels, zu bilden.

Testmedium: Phenol Red Agar Base (Difco) + 5% Saccharose

Anwendung und Auswertung: Auf die mit den Testkulturen beimpften und bei 37° C bebrüteten Platten wurde nach 2 Tagen zum Nachweis des Enzyms eine 1%-ige, wässrige Lösung von Tetramethyl-p-phenylendiamin-dihydrochlorid (KOVACS Reagenz) pipettiert. Eine positive Reaktion ist gekennzeichnet durch eine schwarz-braune Färbung der Kolonien innerhalb von 10 Sekunden.

c) Nitrat Reduktion

Prinzip: Zahlreiche Mikroorganismen vermögen Nitrat zu reduzieren; die meisten nur bis zum Nitrit, die übrigen bis zum gasförmigen Stickstoff (MERCK, Mikrobiologisches Handbuch 1972). Dieser Test diente zum Nachweis mikrobiell gebildeten Nitrits, bzw. zur Identifizierung nitratreduzierender Keime.

Testmedium: Standard II-Nährbouillon (MERCK, Art.Nr. 7884), der 0,1% Kaliumnitrat (MERCK, Art.Nr. 5063) zugesetzt wurde, abgefüllt zu je 15 ml in 20 ml Schraubröhrchen. Jedes Versuchsröhrchen war zusätzlich mit einem DURHAM-Röhrchen versehen.

Anwendung und Auswertung: Die zu prüfenden Keime wurden in dem Nitratmedium 24 Stunden bei 37° C gezüchtet. Nach der Bebrütung wurden mehrere Tropfen GRIESS-ILOSVAY-Reagenz, welches mit Nitrit einen roten Azofarbstoff ergibt, hinzugefügt. Bei Anwesenheit von Nitrit erscheint innerhalb von ca. einer Minute eine rote Farbe, deren Intensität der gebildeten Nitritmenge entspricht.-

Eine negative Reaktion besagt, daß entweder kein Nitratabbau erfolgte oder, daß bis zum Stickstoff denitrifiziert wurde. Mit Hilfe des Zinkstaub-Tests (ZOBELL 1932) wird daher in den Röhrchen mit negativer GRIESS-ILOSVAY-Reaktion geprüft, welche dieser beiden Reaktionen abgelaufen ist. Nach Zugabe einer geringen Menge Zinkstaub (MERCK, Art.Nr. 8774) erscheint bei Anwesenheit von Nitrat in dessen Nähe eine rosa Färbung.Das Nitrat wurde durch das Zink zum Nitrit reduziert, welches nun mit dem GRIESS-ILOSVAY-Reagenz reagiert. Bei positivem Zinkstaub-Test erfolgte also kein Nitratabbau. Ist dieser Test negativ, so ist kein Nitrat im Medium verblieben. Es wurde über Nitrit zu gasförmigem Stickstoff denitrifiziert. Dieses Gas kann in den DURHAM-Röhrchen nachgewiesen werden.

Die bei dem Versuch mitgeführten, unbeimpften Kontrollröhrchen zeigten mit dem GRIESS-ILOSVAY-Reagenz keine Farbreaktion. Diese hätte auf eine nicht bakteriell bedingte Nitritbildung hingedeutet.

3.2.3 Differentialmethoden zur Charakterisierung und Identifizierung der xylitabbauenden Keime.

a) Abbau von Kohlenhydraten

Prinzip: Geprüft wurde die Fähigkeit der Bakterien, verschiedene Kohlenhydrate unter Säurebildung zu verwerten. Eine mögliche Gasbildung wurde am Beispiel der Glucose getestet.

Testmedium: Bacto Phenol Red Broth Base (Difco 0092-01). Dieses flüssige Nährmedium enthält keine Kohlenhydrate. Die zu prüfenden Substanzen wurden steril filtriert und dann dem Grundmedium unter sterilen Bedingungen in einer Konzentration von 1% zugegeben. Zur Reinheitskontrolle wurden die bezukkerten Teströhrchen 24 Stunden bei 37° C bebrütet und an-

schließend auf bakterielle Verunreinigungen untersucht. Die Röhrchen mit Glucose als Substrat waren zur Überprüfung der Gasbildung zusätzlich mit DURHAM-Röhrchen versehen.

Im einzelnen wurden folgende Kohlenhydrate auf bakteriellen Abbau untersucht: Die Aldosen L(+)Arabinose, D(+)Ribose, D(+) Galactose, D(+)Glucose und D(+)Mannose; die Ketosen D(-)Fructose und L(-)Sorbose; der Desoxyzucker L(+)Rhamnose; die Disaccharide Saccharose, Maltose, Lactose, Trehalose, Melibiose und Cellobiose; das Trisaccharid Raffinose; das Polysaccarid Inulin; die Zuckeralkohole Mannit, Sorbit, Dulcit, Xylit, Adonit und meso-Inosit; der dreiwertige Alkohol Glycerin; die Zuckerderivate D-Glucosamin, α-Methylglucosid und Salicin.

Anwendung und Auswertung: Die Beimpfung der Versuchsröhrchen mit den zu prüfenden Stämmen erfolgte jeweils durch Zugabe von 0,025 ml Bakteriensuspension aus einer ca. 20 Stunden alten Thioglycollate-Vorkultur. Der Kohlenhydratabbau wurde als positiv notiert, wenn nach 24-stündiger Bebrütung bei 37° C die Farbe des Indikators Phenolrot durch die entstandene Säure von Rot (alkalisch) nach Gelb (sauer) umgeschlagen war. Das pH-Umschlagsintervall liegt bei Phenolrot zwischen pH 6,4 und pH 8,2. Die End-pH-Werte waren nach 2 Tagen erreicht und wurden direkt in den Kulturröhrchen mittels einer Mikro-pH-Elektrode ermittelt. Eine mögliche Gasbildung aus Glucose konnte in den DURHAM-Röhrchen nachgewiesen werden. Die bei allen Versuchen mitgeführten Kontrollen, und zwar jeweils ein unbeimpftes Phenolrot-Röhrchen mit 1% Kohlenhydrat und eine beimpftes Phenolrot-Röhrchen ohne Kohlenhydrat blieben ausnahmslos unverändert.

Die im folgenden beschriebenen Versuche dienten der Überprüfung verschiedener Resistenz-, Hydrolyse- und Hämolyseeigenschaften, die für die Diagnostik der Streptokokken von besonderer Bedeutung sind. Eine bestimmte Kombination dieser charakteristischen Merkmale bilden nach SHERMAN (1938) die Grundlage der Enterokokken-Differenzierung innerhalb der Gattung Streptococcus.

b) Überprüfung der Thermo-Toleranz

Prinzip: Es sollte festgestellt werden, ob die Keime bei Temperaturen von +10° C und +45° C sowie nach einer Erhitzung auf 60° C für 30 Minuten noch wachsen können.

Testmedium: Phenol Red Broth Base (Difco) + 1% Glucose, abgefüllt zu je 5 ml in 10 ml Schraubröhrchen.

Anwendung und Auswertung: Die Teströhrchen der drei Versuchsreihen wurden mit den Keimen beimpft und jeweils eine Serie bei +10° C im Kryostaten bzw. bei +45° C im Brutschrank bebrütet. Die dritte Serie wurde im Wasserbad 30 Minuten auf +60° C erhitzt, anschließend abgekühlt und bei dieser Temperatur weiterbebrütet. Das Wachstum wurde in Abständen von 24 Stunden nach dem Umschlag des Indikators Phenolrot beurteilt. Die Ermittlung der End-pH-Werte erfolgte nach 7 Tagen direkt in den Kulturröhrchen mittels einer Mikro-pH-Elektrode.

c) Überprüfung der pH-Wert-Toleranz

Prinzip: In diesem Test sollte das Wachstum der Keime in einem Nährmedium mit einem Ausgangs-pH-Wert von 9,6 geprüft werden.

Testmedium: Phenol Red Broth Base (Difco) + 1% Glucose, abgefüllt zu je 5 ml in 10 ml Schraubröhrchen. Das Grundmedium war mit 0,1 n NaOH auf einen pH-Wert von 9,6 eingestellt.

Anwendung und Auswertung: Die mit den zu prüfenden Keimen beimpften Versuchsröhrchen wurden bei 37° C bebrütet. Das Wachstum wurde als positiv notiert, wenn die Farbe des Indikators Phenolrot von Rot nach Gelb umgeschlagen war. Die End-pH-Werte wurden nach 7 Tagen in der oben genannten Weise ermittelt.

d) Überprüfung der NaCl-Toleranz

Prinzip: Das Wachstum der Keime in Nährmedien mit Kochsalzkonzentrationen von 2%, 4% und 6,5% sollte geprüft werden.

Testmedium: Phenol Red Broth Base (Difco) + 0,3% Yeast Extract (Difco) + 1% Glucose, abgefüllt zu je 5 ml in 10 ml Schraubröhrchen. Dem Grundmedium wurde NaCl in Konzentrationen von 2%, 4% und 6,5% zugesetzt.

Anwendung und Auswertung: Die Teströhrchen der drei Versuchsreihen wurden mit den Keimen beimpft und bei 37° C bebrütet. Das Wachstum und die damit verbundene Säurebildung wurde nach dem Umschlag des Indikators Phenolrot beurteilt.

e) Überprüfung der Galle-Toleranz

Prinzip: In diesem Test sollte das Wachstum der Keime in Nährmedien mit Galle-Konzentrationen von 10% und 40% geprüft werden.

Testmedium: Brain Liver Heart Agar (Difco 0058-01) + 5% Blut. Dem Grundmedium wurde Ochsengalle (Bacto-Oxgall) in Konzentrationen von 10% bzw. 40% zugesetzt.

Anwendung und Auswertung: Die Galle-Blut-Agar-Platten wurden mit den Testkeimen beimpft und bei 37° C bebrütet. Nach 1 bis 7 Tagen wurde das Wachstum am Auftreten von Bakterienkolonien registriert.

f) Überprüfung der Kalium-Tellurit-Toleranz

Prinzip: Das Wachstum der Keime in einem Nährmedium mit einer Kalium-Tellurit-Konzentration von 0,04% sollte geprüft werden.

Testmedium: Brain Liver Heart Agar (Difco) + 5% Sterilblut. Dem Grundmedium wurde K_2TeO_3 in einer Konzentration von 0,04% zugesetzt.

Anwendung und Auswertung: Die Tellurit-Blut-Agar-Platten wurden mit den Testkeimen beimpft und bei 37° C bebrütet. Nach 1 bis 7 Tagen wurde das Wachstum am Auftreten von Bakterienkolonien registriert.

g) Reduktion von Methylenblaumilch

Prinzip: Dieser Test diente der Differenzierung der Mikroorganismen aufgrund ihrer enzymatischen Fähigkeit, den Farbindikator Methylenblau in einem Milchmedium zu reduzieren.

Testmedium: Skim milk powder (Oxoid) in einer 10%-igen wässrigen Lösung mit Zusatz von 0,1% bzw. 0,01% Methylenblaulösung, abgefüllt zu je 5 ml in 10 ml Schraubröhrchen.

Anwendung und Auswertung: Nach der Beimpfung wurden die Teströhrchen 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Ein positives Ergebnis ist an der Entfärbung des vorher blauen Indikators, die einer Reduktion entspricht, sowie an der Gerinnung der Milch zu erkennen.

h) Lackmusmilch Test

Prinzip: Lackmusmilch ist ein Differentialmedium zur Bestimmung von verschiedenen metabolischen Funktionen bestimmter Mikroorganismen. Bewertet wurden in diesem Test: (1) die

Fermentation der in der Milch enthaltenen Lactose mit der Bildung von Säure, (2) die Gerinnung der Milchproteine und (3) die Reduktion von Lackmus.

Testmedium: Litmus milk (Oxoid) in einer 10%-igen wässrigen Lösung, abgefüllt zu je 5 ml in 10 ml Schraubröhrchen.

Anwendung und Auswertung: Die Beimpfung der Versuchsröhrchen erfolgte jeweils durch Zugabe von einem Tropfen Bakteriensuspension aus einer ca. 20 Stunden alten Thioglycollate-Vorkultur. Die Bebrütung erfolgte bei 37° C. Nach 1 bis 7 Tagen wurde die Säurebildung und die damit verbundene Gerinnung der Milch registriert. Ebenso die Reduktion des Farbindikators Lackmus durch Farbumschlag von purpur-blau nach rot. Für die diagnostische Aufgabenstellung genügte es jedoch das Wachstum der Keime aufgrund einer dieser metabolischen Aktivitäten zu notieren.

i) Hydrolyse von Stärke

Prinzip: Nachweis der mikrobiellen Stärke-Hydrolyse

Testmedium: Tryptic Soy Agar (Difco) + 0,5% lösliche Stärke (MERCK, Art.Nr. 1252)

Anwendung und Auswertung: Die Stärke-Platten wurden mit den Keimen beimpft und 2 Tage bei 37° C bebrütet. Der Nachweis des Stärkeabbaues erfolgte durch Überschichtung der Platten mit LUGOLS Lösung (MERCK, Art,Nr. 9261). Eine positive Reaktion zeigt sich durch aufgehellte Zonen um die Kolonien, in dem sonst durch den Jod-Stärke-Komplex tiefblau gefärbten Medium.

k) Hydrolyse von Natrium-Hippurat

Prinzip: Nachweis der mikrobiellen Hydrolyse von Na-Hippurat, einem Salz der aliphatischen Aminosäure N-Benzoyl-glycin. Das Enzym Hippurase spaltet diese Säure in Benzoesäure und Glykokoll.

Testmedium: Nutrient broth Nr. 2 (Oxoid CM67) + 0,5% Glucose, abgefüllt zu je 5 ml in 10 ml Schraubröhrchen. Dem Grundmedium wurde 1% Natrium-Hippurat (SCHUCHARDT) zugesetzt.

Anwendung und Auswertung: Die Teströhrchen wurden mit je zwei Tropfen Bakteriensuspension aus einer ca. 20 Stunden alten Thioglycollate-Vorkultur beimpft und 4 Tage bei 37° C bebrütet. Zum Nachweis der Hippurat-Hydrolyse wurden die Röhrchen zentrifugiert und zu je 1 ml Überstand 0,25 ml einer 50%-igen Schwefelsäure pipettiert. Eine positive Reaktion zeigt sich durch die ausgefällte Benzoesäure, die nach wenigen Minuten als deutlicher kristalliner Niederschlag zu erkennen ist.

l) Hydrolyse von Aesculin

Prinzip: Nachweis der mikrobiellen Hydrolyse des Glykosids Aesculin in Aesculetin und Glucose.

Testmedium: Standard II-Nähragar (MERCK, Art.Nr. 7883) + 1% Aesculin (MERCK, Art.Nr.842) als Schrägagar in 20 ml Schraubröhrchen. Dem Grundmedium wurde als Indikator für die Aesculin-Spaltung Eisenzitrat in einer Konzentration von 0,05% zugesetzt. Dieses Eisensalz reagiert mit dem Aesculetin unter Bildung eines schwarz-braunen Komplexes.

Anwendung und Auswertung: Die Schrägagarröhrchen wurden mit den Keimen beimpft und 4 Tage bei 37° C bebrütet. Eine positive Reaktion ist am Auftreten einer schwarz-braunen Färbung in der Umgebung des Bakterienrasens zu erkennen.

m) Hydrolyse von Arginin

Prinzip: Nachweis des mikrobiellen Abbaues der Aminosäure Arginin über das Dihydrolase-System, unter Freisetzung von Ammoniak.

Testmedium: Arginine Broth nach NIVEN et al. (1942); vgl. COWAN and STEEL (1974) p. 148.

Anwendung und Auswertung: Die zu prüfenden Keime wurden in dem Argininmedium 4 Tage bei 37° C gezüchtet. Zum Nachweis der Arginin-Hydrolyse wurde jeweils 1 Tropfen Bakteriensuspension aus den Kulturröhrchen auf einen Objektträger gegeben und mit einem Tropfen NESSLER´s Reagenz vermischt. Die positive Reaktion wird durch die Anwesenheit von freiem Ammoniak im Medium am sofortigen Auftreten einer gelborangen bis braunen Färbung sichtbar.

n) Hämolyse Test

Prinzip: Zahlreiche Streptokokkenarten besitzen die Fähigkeit lösliches Hämolysin zu bilden, das auf der Oberfläche von Blut-Agar-Platten zur Ausbildung unterschiedlicher hämolytischer Zonen um die Bakterienkolonien führt. Es werden drei Hämolyseformen unterschieden; (1) Alpha-Hämolyse: unscharf begrenzte, grünliche Zone unmittelbar um die Einzelkolonie (Vergrünung); (2) Beta-Hämolyse: scharf begrenzte, völlig aufgehellte Zone um die Einzelkolonie (Totale Hämolyse); (3) Gamma-Hämolyse: keine Veränderung des Blutagars. Dieser Test diente dem Nachweis der verschiedenen hämolytischen Aktivitäten.

Testmedium: Brain Liver Heart Agar (Difco) + 5% Sterilblut

Anwendung und Auswertung: Die Testkulturen wurden auf den Blut-Agar-Platten mit einer sterilen Öse fraktioniert aus-

gestrichen und bei 37° C bebrütet. Nach 2 Tagen wurden die Platten auf mögliche hämolytische Veränderungen untersucht.

Die serologischen Untersuchungen der Streptokokkenstämme wurden am Institut für Hygiene der Bundesanstalt für Milchforschung in Kiel durchgeführt, wofür ich an dieser Stelle Herrn Dr. G. Hahn besonders danken möchte.

Zur Diagnostik GRAM-negativer Stäbchen (RX2 und HX1) wurden die im folgenden aufgeführten Versuche zusätzlich herangezogen.

o) Kombinierte Prüfung auf Sulfidbildung und Indolbildung

Prinzip: In diesem Test sollte bestimmt werden, ob die betreffenden Keime (1) aus schwefelhaltigen Aminosäuren Hydrogensulfid (H_2S) bilden bzw. (2) aus der aromatischen Aminosäure Tryptophan Indol abspalten können.

Testmedium: SIM-Nährboden (MERCK, Art.Nr. 5470); dieser Differenzierungsnährboden dient neben der Prüfung auf Sulfidbildung und Indolbildung auch zur Prüfung der Beweglichkeit (motility) der Keime.

Anwendung und Auswertung: Die Kulturen wurden im Stichverfahren dem in Hochschicht erstarrten Nährboden mit einer sterilen Nadel eingeimpft und 24 Stunden bei 37° C bebrütet. H_2S-Bildung tritt in Form einer Schwärzung entlang dem Stichkanal (unbeweglicher Keim) oder im gesamten Nährboden (beweglicher Keim) auf. Der Indolnachweis wurde am Ende der Ablesung durch Überschichten mit KOVACS Indolreagenz (MERCK, Art.Nr. 9293) vorgenommen. Bei Anwesenheit freien Indols tritt nach wenigen Minuten eine purpurrote Verfärbung der Reagenzschicht auf.

p) Urease Test

Prinzip: Nachweis des mikrobiell gebildeten Enzyms Urease, welches Harnstoff zu Kohlendioxid und Ammoniak hydrolysiert.

Testmedium: Harnstoff-Agar nach CHRISTENSEN (MERCK, Art.Nr. 8492); dieses Nährmedium enthält Phenolrot als pH-Indikator.

Anwendung und Auswertung: Die Oberfläche des zur Erstarrung in Schraubröhrchen schräggelegten Harnstoff-Agars wurde massiv mit den zu untersuchenden Keimen beimpft und 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Die positive Harnstoffspaltung zeigt sich durch die Freisetzung von Ammoniak, der eine alkalische Reaktion des Mediums und damit einen Farbumschlag des pH-Indikators Phenolrot von Gelb nach Rot bedingt.

q) VOGES-PROSKAUER Test

Prinzip: Dieser Test diente dem Nachweis von Acetylmethylcarbinol (Acetoin), einem neutralen Endprodukt der Glucosefermentation.

Testmedium: VOGES-PROSKAUER Broth nach CLARK and LUBS (1915); vgl. MAC FADDIN (1976) p. 198.

Anwendung und Auswertung: Die Teströhrchen wurden mit je einem Tropfen Vorkultur beimpft und bei 37° C bebrütet. Der Nachweis der VOGES-PROSKAUER-Reaktion erfolgte nach 2 Tagen. Pro Röhrchen wurden 0,6 ml einer 5%-igen alkoholischen Naphthollösung (BARRITT-Reagenz) und 0,2 ml einer 40%-igen Kalilauge zugesetzt. Anschließend wurden die Röhrchen kräftig geschüttelt und ca. 30 Minuten offen stehen lassen, um eventuell vorhandenes Acetoin durch den atmosphärischen Sauerstoff zu oxidieren, was für die Farbreaktion wichtig ist. Bei positiver Reaktion tritt nach einigen Minuten eine deutliche Rotfärbung auf.

r) Citrat Test

Prinzip: Nachweis mikrobiellen Wachstums auf vollsynthetischen Nährböden mit Citrat als ausschließlicher Kohlenstoffquelle.

Testmedium: SIMMONS-Citrat-Agar (MERCK, Art.Nr. 2501) als Schrägagar zu je 5 ml in 20 ml Schraubröhrchen. Dieses Nährmedium enthält Bromthymolblau als pH-Indikator.

Anwendung und Auswertung: Der Citrat-Agar wurde mit den zu untersuchenden Keimen beimpft und 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Das Wachstum der Keime bzw. die Citratverwertung führt zu einer Alkalisierung des Nährmediums, die durch einen Farbumschlag des pH-Indikators Bromthymolblau von Gelb nach Blau angezeigt wird.

s) KCN-Resistenz Test

Prinzip: Nachweis mikrobiellen Wachstums in Kaliumcyanidhaltigen Nährmedien.

Testmedium: KCN-Bouillon nach MØLLER (MERCK, Art.Nr. 5412), abgefüllt zu je 5 ml in 10 ml Schraubröhrchen.

Anwendung und Auswertung: Jedes Röhrchen wurde mit einem Tropfen Vorkultur der betreffenden Teststämme beimpft und bei 37° C bebrütet. Damit das Inoculat die KCN-Bouillon nicht trübte, wurden die Bakteriensuspensionen mit physiologischer Kochsalzlösung stark verdünnt. Das Wachstum wurde täglich (bis zu 4 Tagen) kontrolliert. Eine Trübung des Nährmediums, auch wenn diese nur sehr schwach ist, gilt als positives Resultat, ein völlig klar gebliebenes Nährmedium als negatives.
Die als Kontrolle parallel hierzu mitgeführten, beimpften Kulturröhrchen mit KCN-freier Bouillon zeigten jeweils ein deutliches Wachstum.

t) Gelatineverflüssigung

Prinzip: Dieser Test diente dem Nachweis mikrobiell gebildeter Gelatinasen, welche Gelatine, ein Protein vom Kollagen-Typ, hydrolysieren bzw. verflüssigen.

Testmedium: Nähragar (MERCK, Art.Nr. 5450) mit Zusatz von 0,4% Nährgelatine (MERCK, Art.Nr. 4069) als Platten. Dieser Gelatine-Agar nach FRAZIER (1926) hat den Vorteil, daß die Gelatine im Agar gelöst ist und das Medium bei 37° C nicht schmilzt.

Anwendung und Auswertung: Jeweils 3 Gelatine-Agar-Platten wurden mit den Testkeimen beimpft und bei 37° C bebrütet. Der Nachweis der Gelatineverflüssigung erfolgte nach 3 Tagen, nach 7 Tagen und nach 2 Wochen durch Überfluten der bewachsenen Platten (jeweils einer Serie) mit 5 bis 10 ml einer salzsauren Quecksilberchlorid-Lösung, die mit der Gelatine in dem Medium unter Bildung einer Opazität reagiert. Zonen, in denen Gelatine hydrolysiert wird bleiben klar und zeigen die positive Reaktion an.

Zur Überprüfung dieser Methode wurde als Referenzstamm der Gelatinase-positive Keim Proteus mirabilis mitgetestet, der bereits nach 3 Tagen eine positive Reaktion zeigte. Dieser Referenzstamm wurde vom Mikrobiologischen Institut der Technischen Hochschule in Darmstadt in Reinkultur zur Verfügung gestellt, wofür an dieser Stelle gedankt wird.

u) Decarboxylase Tests (Lysin-Ornithin)

Prinzip: Nachweis der enzymatischen Fähigkeit von Mikroorganismen, die Aminosäuren Lysin und/oder Ornithin unter Bildung eines Amins und CO_2 zu dacarboxylieren.

Testmedium: Decarboxylase-Medium nach MØLLER (1955); vgl. COWAN and STEEL (1974) pp. 149, 150; MAC FADDIN (1976) pp. 56, 57; Dieses Medium enthält Bromkresolpurpur und Kresolrot als pH-Indikatoren. Lysin oder Ornithin wurden als Reaktionskörper in Konzentrationen von 1% zugegeben. Aufgrund der hohen Azidität von Ornithin war es erforderlich, den pH-Wert in dem betreffenden Medium mit 10 n NaOH neu auf den Basis-pH von 6,0 einzustellen. Die in enge Röhrchen abgefüllten, gebrauchsfertigen Nährmedien wurden nach der Sterilisation ferner mit einer 3 bis 5 mm hohen Schicht sterilisierten Paraffinöls (MERCK, Art.Nr. 7160) überschichtet. Diese dient als Luftabschluß, um eine oxidative Desaminierung der Aminosäuren, was eine Alkalisierung des Nährmediums bewirken würde, zu verhindern.

Anwendung und Auswertung: Die Beimpfung der Teströhrchen erfolgte von einer ca. 20 Stunden alten Thioglycollate-Vorkultur mittels zentralem Stich durch die Paraffinschicht. Nach der Bebrütung bei 37° C wurden die Kulturröhrchen täglich (bis zu 4 Tagen) kontrolliert. Die Fermentation der im Medium enthaltenen Glucose führt zunächst zu einer Ansäuerung des Nährbodens, der durch einen Farbumschlag des pH-Indikators Bromkresolpurpur nach Gelb angezeigt wird. Die anschließenden Farbreaktionen der beiden Aminosäuren sind gleich. Im positiven Falle wird Lysin zu Cadaverin und Ornithin zu Putrescin decarboxyliert. Die Anhäufung dieser Amine hat dann ein Ansteigen des pH-Wertes und damit einen Farbumschlag der pH-Indikatoren nach Violett zur Folge.

Die mitgeführten, beimpften Kontrollröhrchen, die nur das Basalmedium ohne Aminosäuren enthielten, zeigten ausschließlich eine Gelbfärbung aufgrund der Glucosefermentation. Ist letzteres nicht der Fall, kann der Test nicht gewertet werden.

v) Kombinierter Malonat-Phenylalanin Test (SHAW and CLARKE)

Prinzip: In diesem Test sollte bestimmt werden,ob die betreffenden Keime (1) Natriummalonat verwerten bzw. (2) die aromatische Aminosäure Phenylalanin zu Phenylpyruvat desaminieren können. Die Leistungsfähigkeit des kombinierten Tests wurde von EWING et al. (1957) bestätigt.

Testmedium: Malonat-Phenylalanin-Bouillon nach SHAW and CLARKE (MERCK, Art.Nr. 5419); Abfüllung zu je 3 ml in enge Röhrchen. Dieses Nährmedium enthält Bromthymolblau als pH-Indikator und Natriummalonat sowie L-Phenylalanin als Reaktionskörper.

Anwendung und Auswertung: Die Versuchsröhrchen wurden massiv, von stammreinen Kolonien ausgehend beimpft und 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Zunächst wurde auf Malonatabbau abgelesen. Bei positiver Reaktion erfolgt eine Alkalisierung des Mediums, die durch einen Farbumschlag des pH-Indikators Bromthymolblau von Grün nach Blau angezeigt wird. Zum Nachweis der Phenylalanindesaminierung wurde der Nährboden anschließend durch Zugabe einiger Tropfen 0,1 n HCl angesäuert bis eine gelbe Farbe auftrat. Dann wurden 3 bis 4 Tropfen einer 10%-igen wässrigen Lösung von Eisen (III)-chlorid zugesetzt. Bei positiver Reaktion reagiert das gebildete Phenylpyruvat mit den Eisen (III)-Ionen und ergibt innerhalb von 2 bis 3 Minuten einen grünen Farbkomplex.

w) Phosphatase Test

Prinzip: Nachweis einer mikrobiellen Phosphatase-Aktivität mit der enzymatischen Spaltung von Phenolphthaleindiphosphat.

Testmedium: Nähragar (MERCK, Art.Nr. 5450) mit Zusatz von 0,01% Phenolphthaleindiphosphat; vgl. HARRIGAN and MAC CANCE (1966) pp. 66, 67.

Anwendung und Auswertung: Die PDP-Agar-Platten wurden nach der Beimpfung aus einer ca. 20 Stunden alten Thioglycollate-Vorkultur bei 37° C bebrütet. Der Phophatase-Nachweis erfolgte nach 24 Stunden. In den Deckel der Petrischale wurde 0,1 ml konzentrierte Ammoniak-Lösung gegeben und die bewachsenen Platten umgekehrt darübergestellt. Die Ammoniak-Dämpfe reagieren im positiven Falle mit dem durch die Phosphatasen freigesetzten Phenolphthalein und die Bakterienkolonien erscheinen in einer rosa bis roten Farbe.

x) Oxidation-Fermentation Test (HUGH and LEIFSON)

Prinzip: Dieser Test diente zur Erkennung des oxidativen und des fermentativen Stoffwechsels von Mikroorganismen beim Abbau von Kohlenhydraten.

Testmedium: OF-Testnährboden nach HUGH and LEIFSON (MERCK, Art.Nr.10282); Abfüllung zu je 5 ml in 20 ml Schraubröhrchen. Dieses Nährmedium enthält Bromthymolblau als pH-Indikator. Als Reaktionskörper wurde Glucose in einer Konzentration von 1% zugesetzt. Die Hälfte der Röhrchen wurde zur Überprüfung des fermentativen Abbaues mit einer 1 cm hohen Schicht sterilen Paraffinöls (MERCK, Art.Mr. 7160) überschichtet.

Anwendung und Auswertung: Jeweils ein Röhrchen mit und ein Röhrchen ohne Paraffinverschluß wurde im Stichverfahren bis zum Boden beimpft und 2 Tage bei 37° C inkubiert. Nach der Bebrütung ist auf eine Säurebildung (Farbumschlag nach Gelb) und auf Gasbildung (Sprengung des Agars, Gasblasenansammlung unter der Paraffinschicht) zu achten und außerdem festzustellen, in welchen Röhrchen eine Gelbfärbung auftritt. Gelbfärbung sowohl in den offenen wie auch in den überschichteten Röhrchen bedeutet fermentativen Abbau, während alleinige Gelbfärbung in den offenen Röhrchen oxidativen Abbau der zugesetzten Glucose bedeutet. Dabei findet der oxidative Abbau nahe der Oberfläche des Nährbodens statt, während der fermen-

tative Abbau sowohl an der Oberfläche als auch in der Tiefe des Nährbodens vor sich geht.

y) Wachstum auf Selektivnährmedien

Prinzip: In diesem Test sollte geprüft werden,ob und auf welchen der im folgenden genannten Selektivnährmedien die GRAM-negativen Xylitabbauer zu wachsen vermögen.

Testmedien: (1) MAC CONKEY-Agar (MERCK, Art.Nr. 5465)
(2) ROGOSA-Agar (MERCK, Art.Nr. 5413)
(3) Sorbinsäure-Agar (MERCK, Art,Nr. 10451)
(4) Salmonella-Shigella-Agar (MERCK, Art.Nr.7667)
(5) Cetrimid-Agar (MERCK, Art.Nr. 5284)

Anwendung und Auswertung: Die einzelnen Selektivmedien wurden mit den zu prüfenden Stämmen, ausgehend von einer ca. 20 Stunden alten Thioglycollate-Vorkultur,beimpft und bei 37 °C bebrütet. In Abständen von einem Tag (bis zu einer Woche) wurde das Wachstum der Keime auf den Platten kontrolliert.

Bei der Auswahl der im einzelnen genannten Methoden zur Charakterisierung und Differenzierung der xylitabbauenden Keime, sowie bei der Bereitung und Sterilisation der Testmedien, wurde nach den in der Bakteriologie geltenden Prinzipien und methodischen Grundlagen verfahren. Folgende Literaturquellen wurden benutzt: BERGEY´s Manual of Determinative Bacteriology (1974); MAC FADDIN, Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria (1976); COWAN and STEEL, Manual for the Identification of Medical Bacteria (1974); HARRIGAN and MAC CANCE, Laboratory Methods in Microbiology (1966); LENNETTE, SPAULDING, TRUANT, Manual of Clinical Microbiology (1974); MERCK, Mikrobiologisches Handbuch (1972).

3.2.4 Methoden zur Gruppierung nach morphologischen Hauptmerkmalen

a) GRAM-Färbung

Prinzip: Die GRAM-Reaktion ist ein genetisch determiniertes Charakteristikum einer jeden Bakterienzelle. Die bei der Klassifizierung von Mikroorganismen übliche Unterscheidung in GRAM-positive und GRAM-negative Bakterien beruht auf unterschiedlich strukturierten Zellwänden. Die GRAM-Färbung dient zur Erkennung dieses Differenzierungsmerkmals, wobei zu beachten ist, daß bei einigen Bakterienspezies variable oder auch unbestimmbare GRAM-Reaktionen zu verzeichnen sind.

Anwendung: Zur Anwendung kam neben der klassischen GRAM-Methode insbesondere bei dem Stamm HX1 auch die sogenannte HUCKER-Modifikation (HUCKER and CONN, 1923); vgl. COWAN and STEEL (1974) p. 163. Die Teststämme wurden 24 Stunden in Thioglycollate-Nährlösung vorkultiviert, anschließend in der erforderlichen Weise auf Objektträgern fixiert und nach den oben genannten Methoden gefärbt. Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop. Dieses Verfahren diente zugleich der eingehenden Überprüfung der einzelnen Kulturen auf Gleichartigkeit und Stammreinheit.

b) Elektronenmikroskopische Untersuchung

Die elektronenoptischen Untersuchungen sollten Aufschluß geben über zelluläre Feinstrukturen (Begeißelung, Sporen, Kapseln etc.) insbesondere der GRAM-negativen Stäbchen (HX1 und RX2). Sie wurden bei diesen beiden Stämmen nach dem Agarfiltrationsverfahren (KELLENBERGER and ARBER, 1957) und bei einem Vertreter der Streptokokkenstämme (RX1) mit Hilfe der Negativkontrastierung am Institut für Mikrobiologie der Technischen Hochschule in Darmstadt durchgeführt. Für die freundliche Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Preusser möchte ich mich an dieser Stelle besonders bedanken.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Charakterisierung und Identifizierung der xylitabbauenden Keime

4.1 Allgemeine Gruppierung nach Hauptmerkmalen

Die Bestimmung morphologischer und physiologischer Merkmale anhand allgemeiner Untersuchungsmethoden (vgl.3.2.2 u. 3.2.4) führte zunächst zu einer "groben" taxonomischen Einteilung der untersuchten xylitabbauenden Bakterienstämme.

4.1.1 Morphologische Charakterisierung

Von den 26 untersuchten Bakterienkulturen zeigten 24 Stämme eine GRAM-positive Reaktion. Die beiden Stämme RX2 und HX1 waren GRAM-negativ. Auf Besonderheiten bei der GRAM-Reaktion des Stammes HX1 wird in Abschnitt 4.4.2 hingewiesen.

Bei sämtlichen GRAM-positiven Organismen handelte es sich um Kokken, die zudem in charakteristischer Weise in Paaren oder Ketten unterschiedlicher Länge angeordnet waren. Sie zeigten untereinander keine entscheidenden morphologischen Abweichungen. Die elektronenoptische Aufnahme (Abb. 1) gibt Aufschluß über die zelluläre Organisation dieser Gruppe von Organismen, dargestellt am Stamm RX1. Der makroskopische Vergleich der Kolonieformen, nach eintägigem Wachstum auf einem xylithaltigen Festmedium (Phenol Red Agar Base + 1% Xylit), ergab ebenfalls keinen Hinweis auf strukturelle Unterschiede der GRAM-positiven Organismen. Die Einzelkolonien waren jeweils klein, mit einem Durchmesser von ca. 0,2 bis 0,9 mm, kreisförmig und semitransparent.

Die GRAM-negativen Organismen HX1 und RX2 waren im Lichtmikroskop deutlich als Stäbchen zu erkennen, die einzeln oder

in Gruppen, jedoch nicht in Ketten angeordnet waren. Die beiden Stämme konnten zunächst nach Größe und Aussehen der Zellen voneinander unterschieden werden.

Bezeichnend für den Stamm HX1 waren die auffällig kleinen, geraden oder teilweise leicht gekrümmten Zellen mit deutlich abgerundeten Polen. Besonders in jungen Kolonien konnte diese Zellform beobachtet werden, die im Erscheinungsbild an Kokken erinnert. GRAM-Färbungen von Kolonien, nach 5-tägigem Wachstum auf einem xylithaltigen Festmedium (Phenol Red Agar Base + 1% Xylit), zeigten dagegen Zellen in typischer, langgestreckter Stäbchenform. Auf den beiden elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 2 und Abb. 3) ist dieser Stamm dargestellt, nach 2-tägigem Wachstum in einem flüssigen Nährmedium (Bacto NIH-Thioglycollate-Broth + 0,5% Glucose). Deutlich ist zu erkennen, ebenso wie in den GRAM-Präparaten, die für den Stamm HX1 charakteristische, pallisadenförmige Anordnung der Stäbchen, zusammen mit abgewinkelt angeordneten Zellen im Stadium der Zellteilung; daneben eine Vielzahl einzeln liegender Stäbchen.Die Aufnahmen zeigen folgende strukturelle Einzelheiten: (1) die Ablagerung von intrazellulären Substanzen an beiden Polen, die als Speicher- oder Reservestoffe angesehen werden können (SCHLEGEL 1969); (2) bei einigen Zellen ist eine unregelmäßige Quersegmentierung, wie sie bei Corynebakterien beobachtet wird, zu erkennen; (3) die Zellwände der Keime sind anscheinend von dünnen Schleimhüllen umgeben; (4) die Zellen sind nicht begeißelt. Von besonderem taxonomischem Wert ist dabei die Feststellung (4), daß der Stamm HX1 unbeweglich ist. Das makroskopische Erscheinungsbild dieses Stammes, nach 2-tägigem Wachstum auf einem xylithaltigen Festmedium (s.o.) wurde bestimmt durch die sehr kleinen Kolonien mit einem Durchmesser von ca. 0,2 bis 0,6 mm. Sie waren durchscheinend weiß, kreisrund und scharf begrenzt. Die Oberfläche war gleichmäßig konvex und matt glänzend.

Der Stamm RX2 ist gekennzeichnet durch relativ große, stäbchenförmige Zellen mit abgerundeten Polen. Eine charakteristische Anordnung der Zellen konnte weder in den GRAM-Präparaten noch bei der Betrachtung der lebenden Organismen durch das Phasenkontrastmikroskop festgestellt werden. Die Keime waren meistens einzeln oder in nicht strukturierten Zellaggregaten vertreten. Die Begeißelung der Organismen ist deutlich auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Stammes RX2 (Abb. 4 und 5) zu erkennen. Dagegen konnte die Art der Begeißelung im Elektronenmikroskop nicht genau ermittelt werden, da die Zellen offenbar einen Teil ihrer Geißeln während der Präparation (Agarfiltration) verloren hatten. Die lateral, an den Längsseiten der Zellen inserierten Geißeln geben dennoch einen sicheren Hinweis auf eine peritriche Begeißelung dieses Keimes. Weitere Zellstrukturen sind auf diesen Aufnahmen nicht zu erkennen.
Die Begeißelung des Stammes RX2 und die damit verbundene Beweglichkeit der Organismen wurde ebenfalls deutlich bei der makroskopischen Betrachtung der Bakterienkulturen. Bereits nach 1-tägigem Wachstum auf einem xylithaltigen Festmedium (s.o.) war die Agaroberfläche teilweise von einem dichten Bakterienrasen bedeckt. Einzelkolonien entstanden nur an den Stellen, die beim Ausstreichen der Bakteriensuspension mit der Öse nur schwach beimpft wurden. Sie waren an den Rändern unscharf begrenzt, an der Oberfläche glatt und weißlich glänzend. Die Größe der Kolonien lag etwa bei 0,8 bis 1,8 mm. Ebenso war eine diffuse Ausbreitung der Organismen im Agar der Stichkulturen (Bacto Phenol Red Agar Base + 1% Xylit; SIM-Agar) zu beobachten.

Die Bildung von Endosporen konnte, wie die weitere Auswertung der elektronenoptischen Aufnahmen ergab, bei keinem der untersuchten Stämme festgestellt werden.

4.1.2 Gruppierung nach physiologischen Hauptmerkmalen

Bei der ersten Auswahl der Tests, die zur physiologischen Differenzierung herangezogen wurden, standen die Überlegungen der klassischen Taxonomie im Vordergrund, wonach einige ausgewählte Merkmale darüber entscheiden können, welchen Gruppen oder Familien ein Organismus zuzuordnen ist. Geprüft wurden (1) der Abbau von Glucose; bewertet wurden dabei die Bildung von Säure und Gas; (2) das Wachstum der Organismen unter aeroben und anaeroben Bedingungen. Wegen der besonderen Bedeutung für die Taxonomie GRAM-negativer Stäbchen und zur Differenzierung GRAM-positiver Kokken wurde weiterhin überprüft (3) die Bildung von Katalase und Oxidase, Enzyme des aeroben Stoffwechsels; (4) die Reduktion von Nitrat zu Nitrit und bei den Stämmen RX2 und HX1 zusätzlich das Wachstum auf MAC CONKEY-Agar.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammen mit den morphologischen Merkmalen dargestellt.

Alle untersuchten Stämme konnten Glucose verwerten und daraus Säure bilden. Gasbildung war lediglich beim Stamm RX2 zu beobachten. Das Wachstum der Bakterien und der Abbau der Glucose erfolgten innerhalb von 24 Stunden. Eine deutliche Wachstumsverzögerung zeigte als einziger der Stamm HX1. Erst nach etwa 48 Stunden wurde der Glucoseabbau durch Farbumschlag des pH-Indikators Phenolrot angezeigt. Die End-pH-Werte beim Abbau der Glucose lagen bei den 24 GRAM-positiven (Streptokokken) Stämmen stets unter pH 4,0; bei den GRAM-negativen Stämmen HX1 und RX2 wurden Werte um pH 4,7 erreicht. Sämtliche Stämme konnten unter aeroben und anaeroben Bedingungen wachsen. Die Bildung des Enzyms Oxidase konnte bei keinem der Stämme festgestellt werden. Das Enzym Katalase wurde lediglich vom Stamm RX2 gebildet. Der Stamm HX1 reduzierte Nitrat zu Nitrit.

Tab. 1: Morphologische und physiologische Hauptmerkmale der Teststämme

Stämme	GRAM	Form	Bew.	Sp.	Wachstum aerob	Wachstum anaerob	Gluc.	Katal.	Oxid.	NO_3
RX1	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
RX2	-	St.	+	-	+	+	S/G	+	-	-
RX3	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
RX4	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
RX5	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
RX6	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
RX7	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
RX8	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
RX9	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
RX10	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
RX11	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
RX12	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
RX13	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
T1X40	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
T1X43	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
T1X94	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
T2X1	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
T2X103	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
T5X99	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
T5X100	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
T5X102	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
T5X118	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
T5X119	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
T5X120	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
T5X122	+	K	-	-	+	+	S	-	-	-
HX1	-	St.	-	-	+	+	S	-	-	+

+ = positive Reaktion; S = Säurebildung aus Glucose; K = Kokken;
- = negative Reaktion; G = Gasbildung aus Glucose; St.= Stäbchen;
Sp.= Sporenbildung; Bew.= Beweglichkeit;

4.1.3 Auswertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse aus den beiden vorangegangenen Abschnitten (4.1.1 und 4.1.2) ermöglichen eine Differenzierung sowie eine vorläufige Klassifizierung der untersuchten Mikroorganismen.

Die Bakterienstämme konnten aufgrund morphologischer und physiologischer Hauptmerkmale in eine Gruppe GRAM-positiver Organismen (1) und in die beiden GRAM-negativen Stämme RX2 (2) und HX1 (3) unterschieden werden:

(1) Hauptmerkmale der GRAM-positiven Stämme

Die Stämme RX1, RX3, RX4, RX6, RX5, RX7, RX8, RX9, RX10, RX11, RX12, RX13; T1X40, T1X43, T1X94; T2X1, T2X103; T5X99, T5X100, T5X102, T5X118, T5X119, T5X120 und T5X122 zeigten Übereinstimmung in allen genannten Differenzierungsmerkmalen. Der Bakterientyp entspricht folgender Definition: (a) GRAM-positive (b) in Paaren oder Ketten unterschiedlicher Länge angeordnete Kokken, (c) unbeweglich, (d) asporogen,(e) Säurebildung aus Glucose, (f) fakultativ anaerob, (g) chemoorganotroph, (h) Katalase negativ, (i) Oxidase negativ, (k) Nitratreduktion negativ. Nach BERGEY´s Manual (1974) sind dies die Kriterien zur Erkennung und Einteilung der Streptokokken. Doch erfordert die systematische Einordnung der genannten Stämme eine Abgrenzung gegenüber weiteren GRAM-positiven Kokken.

Der Vergleich mit den Differenzierungsmerkmalen entsprechender Referenzstämme ist in Tabelle 2 dargestellt. Die Angaben wurden folgender Literatur entnommen: COWAN and STEEL (1974), BERGEY (1974).

Tab. 2: Differenzierungsmerkmale der untersuchten GRAM-positiven, xylitabbauenden Stämme im Vergleich mit den Eigenschaften der Referenzstämme

Tests	1	2	3	4	5
Form	K	K	K	K	K
Beweglichkeit	-	-	-	-	-
Sporen	-	-	-	-	-
Wachstum aerob	+	+	+	+	-
Wachstum anaerob	-	+	+	+	+
Katalase	+	+	-	-	-
Oxidase	-	-	-	-	-
Glucose (Säure)	d	+	+	+	+/-
Nitratreduktion	-	+	-	-	d

1 Micrococcus
2 Staphylococcus
3 Teststämme
4 Streptococcus
5 Peptococcus/Peptostreptococcus

Erklärung: K = Kokken; d = unterschiedliche Reaktionen

Der Tabelle ist zu entnehmen, daß die Eigenschaften der xylit abbauenden Kokken (3) allein mit den für Streptokokken (4) charakteristischen Merkmalen in allen Punkten übereinstimmen. Die Gattung Micrococcus (1) unterscheidet sich wesentlich durch das obligat aerobe Wachstum, die beiden Gattungen Peptococcus und Peptostreptococcus (5) durch das obligat anaerobe Wachstum von den beiden zuerst genannten Gruppen

(3 und 4). Staphylokokken (2) bilden Katalase und reduzieren Nitrat. Diese beiden physiologischen Merkmale ermöglichen, insbesondere unter Berücksichtigung der zellulären Organisation, eine Abgrenzung der xylitabbauenden Kokken von den Staphylokokken und damit eine sichere taxonomische Einordnung in die Familie der Streptokokken. Die weitere Differenzierung und Identifizierung ist im Abschnitt 4.2 beschrieben.

(2) Hauptmerkmale des Stammes RX2

Der Bakterientyp entspricht folgender Definition: (a) GRAM-negative, (b) gerade Stäbchen, (c) beweglich, (d) asporogen, (e) Säure- und Gasbildung aus Glucose,(f) fakultativ anaerob, (g) chemoorganotroph, (h) Katalase positiv, (i) Oxidase negativ, (k) Nitratreduktion negativ,(l) Wachstum auf MAC CONKEY-Agar positiv. Nach diesen Kriterien kann der Stamm RX2 in die Familie der Enterobacteriaceen eingeordnet werden (BERGEY 1974, COWAN and STEEL 1974, LENNETTE et al. 1974). Auf Ausnahmen hinsichtlich der Nitratreduktion, ein für die Enterobacteriaceen charakteristisches Merkmal, wird bei der Identifizierung dieses Keimes in Abschnitt 4.3.2 hingewiesen. Die weitere Charakterisierung des Stammes RX2 erfolgt in Abschnitt 4.3.1.

(3) Hauptmerkmale des Stammes HX1

Der Bakterientyp entspricht folgender Definition: (a) GRAM-negative bzw. GRAM-labile (vgl. 4.4.2), (b) gerade bis leicht gekrümmte Kurzstäbchen, (c) unbeweglich, (d) asporogen, (e) Säurebildung aus Glucose, (f) fakultativ anaerob, (g) chomoorganotroph, (h) Katalase negativ, (i) Oxidase negativ, (k) Nitratreduktion positiv, (l) Wachstum auf MAC CONKEY-Agar negativ. Nach den hier genannten Merkmalen war die taxonomische Stellung dieses Keimes nicht sicher zu bestimmen. Die weitere Charakterisierung des Stammes HX1 erfolgt in Abschnitt 4.4.1.

Abb. 1: Elektronenmikroskopische Darstellung des Stammes RX1

Eigenvergrößerung: 10 000
Totalvergrößerung: 26 000

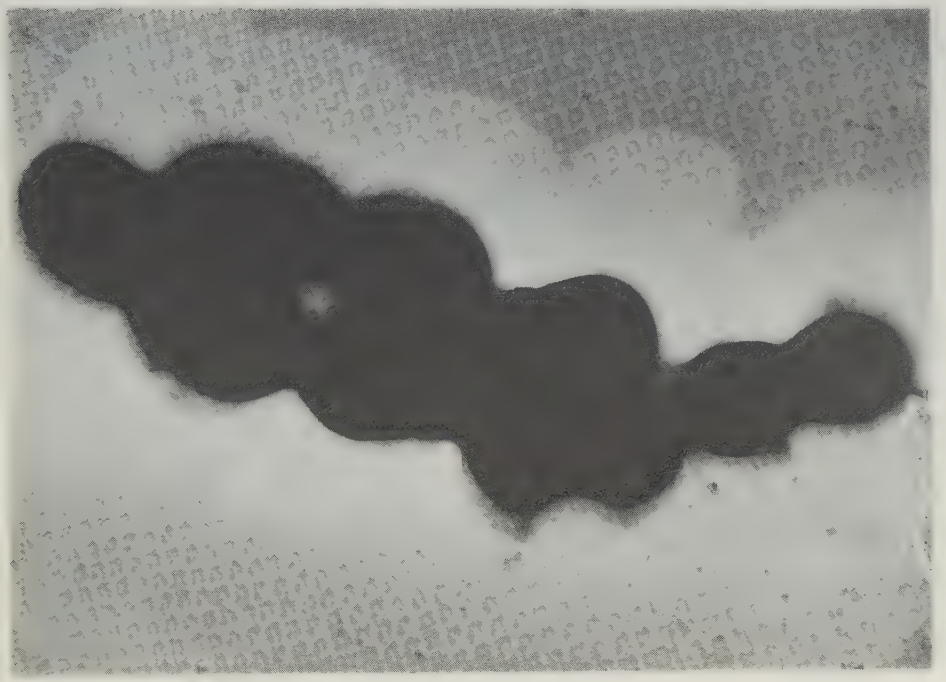


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Darstellung
des Stammes HX1

Eigenvergrößerung: 20 000
Totalvergrößerung: 50 000

Abb. 3: Elektronenmikroskopische Darstellung des Stammes HX1

Eigenvergrößerung: 20 000
Totalvergrößerung: 54 000

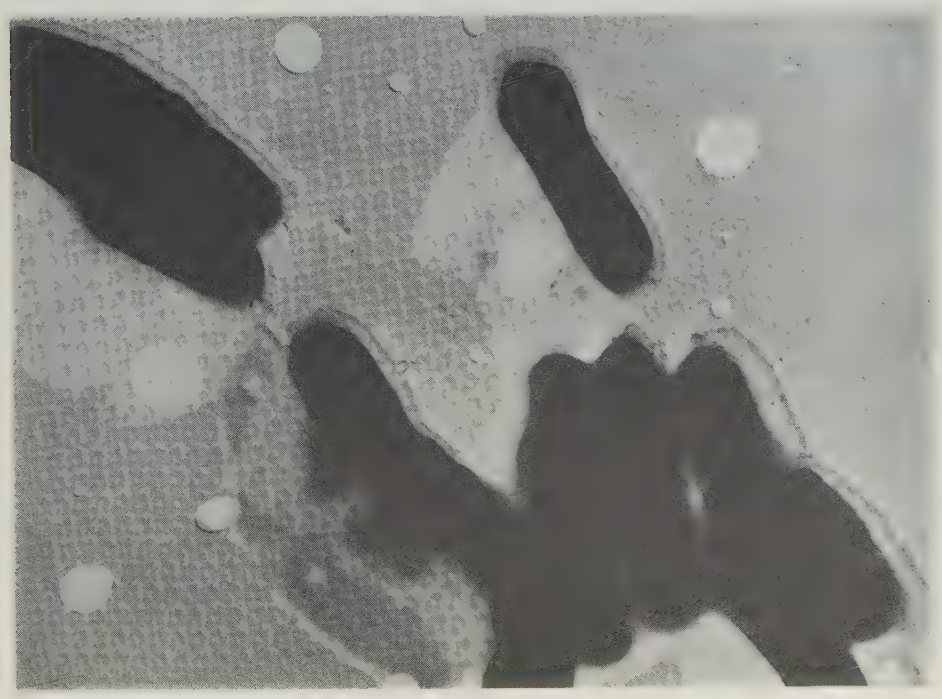


Abb. 4: Elektronenmikroskopische Darstellung des Stammes RX2; Proteus morganii

Eigenvergrößerung: 10 000
Totalvergrößerung: 26 000

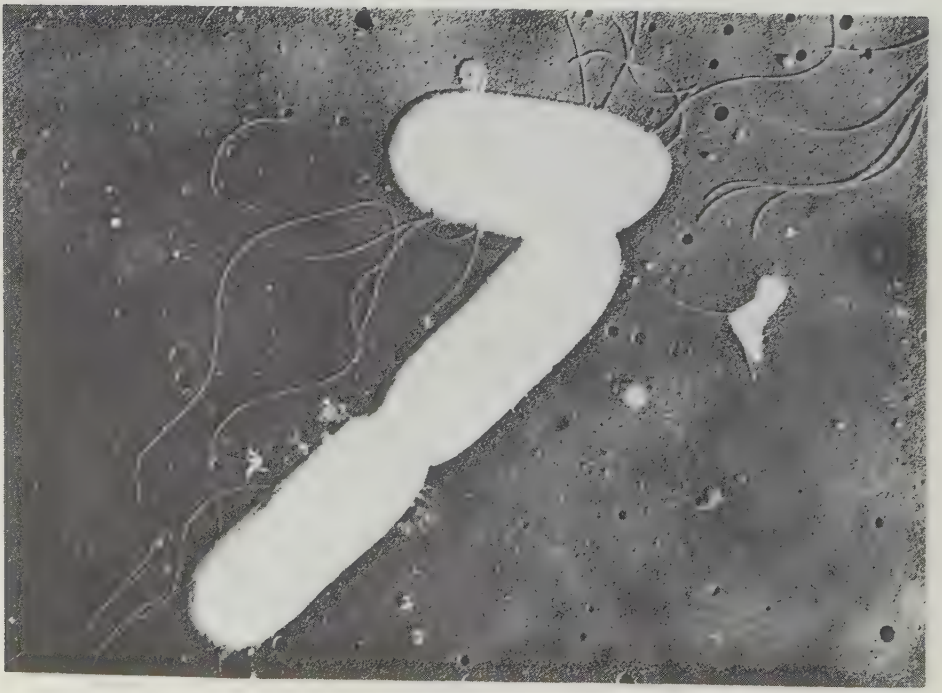
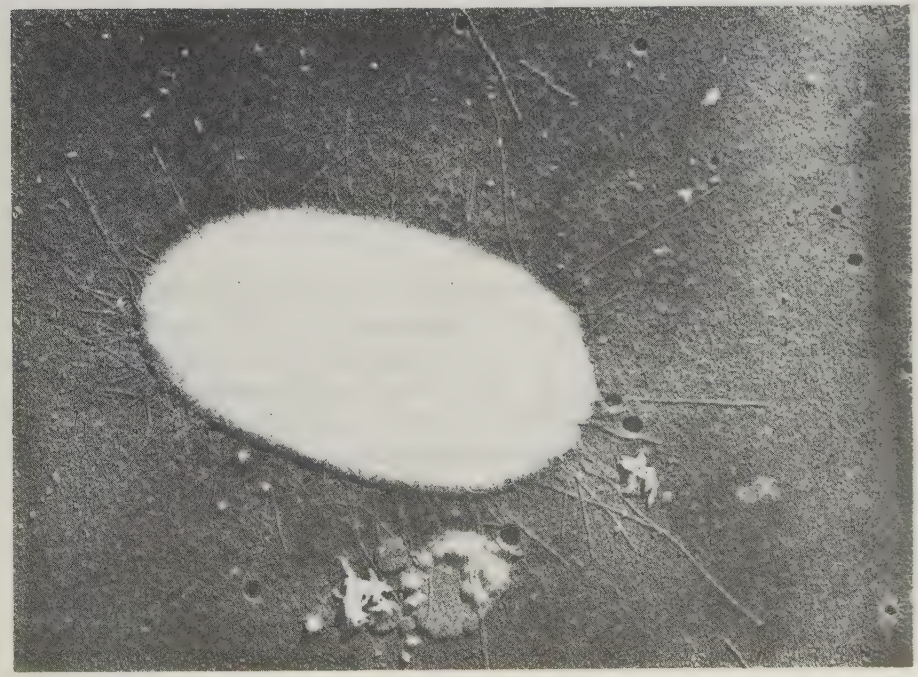


Abb. 5: Elektronenmikroskopische Darstellung des Stammes RX2; Proteus morganii

Die Aufnahme zeigt den Organismus in einer unbeweglichen Wachstumsphase. Zu beachten sind die zahlreichen peritrichen Fimbrien.

Eigenvergrößerung: 10 000
Totalvergrößerung: 46 000



4.2 Charakterisierung und Identifizierung der Streptokokken

Nach BERGEY (1974) werden die Gattungen Leuconostoc, Pediococcus, Aerococcus und Gemella, neben der Gattung Streptococcus, ebenfalls der Familie der Streptokokken zugerechnet. Mit Hilfe der bereits bekannten Eigenschaften konnten die untersuchten xylitabbauenden Kokken von diesen Vertretern der Streptokokkenfamilie systematisch abgegrenzt und der Gattung Streptococcus zugeordnet werden.

Die weitere Differenzierung und Klassifizierung der Streptokokkenspezies innerhalb der Gattung Streptococcus beruht neben dem serologischen Nachweis spezifischer Gruppen- und Typenantigene nach LANCEFIELD auf der Feststellung unterschiedlicher physiologischer Leistungsspektren und Resistenzeigenschaften.

Die serologischen Untersuchungen, die am Institut für Hygiene der Bundesanstalt für Milchforschung in Kiel durchgeführt wurden ergaben, daß die xylitabbauenden Streptokokkenstämme nicht in die bekannten LANCEFIELD-Streptokokken-Gruppen A bis S eingeordnet werden können. Sie reagierten also auch nicht mit den für Enterokokken charakteristischen Gruppenantiseren D und Q.

Der Nachweis der Kohlenhydratverwertung sowie die Überprüfung verschiedener Resistenz-, Hydrolyse- und Hämolyseeigenschften wurde nach den unter 3.2.3 aufgeführten Methoden durchgeführt und die Ergebnisse zur Differenzierung herangezogen.

In den Tabellen 3 und 4 ist das Reaktionsspektrum der 24 xylitabbauenden Streptokokkenstämme zusammenfassend dargestellt.

Tab. 3: Identifizierungs- und Differenzierungsmerkmale der 24 Streptokokkenstämme:
Resistenz-, Hydrolyse- und Hämolyseeigenschften

Tests	RX1	RX3	RX4	RX5	RX6	RX7
Wachstum bei:						
10° C	+	+	+	+	+	+
37° C	+	+	+	+	+	+
45° C	+	+	+	+	+	+
pH 9,6	+	+	+	+	+	+
Thermo-Toleranz						
60° C / 30 Min.	+	+	+	+	+	+
NaCl-Toleranz						
2,0%	+	+	+	+	+	+
4,0%	+	+	+	+	+	+
6,5%	+	+	+	+	+	+
Wachstum in:						
Galle 10%	+	+	+	+	+	+
Galle 40%	+	+	+	+	+	+
Methylenblau 0,1%	-	-	-	-	-	-
Methylenblau 0,01%	+	-	(+)	+	(+)	-
K-Tellurit 0,04%	-	-	-	-	-	-
Lackmusmilch	+	+	+	+	+	+
Hydrolyse von:						
Stärke	-	-	-	-	-	-
Na-Hippurat	-	-	-	-	-	-
Aesculin	+	+	+	+	+	+
Arginin	-	-	-	-	-	-
Hämolyse	-	-	-	-	-	-
Serol. Gruppe	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Erklärung: + = positive Reaktion
- = negative Reaktion
(+) = schwach positive Reaktion
ND = keine Angaben

Tab. 3: (Fortsetzung)

Tests	RX8	RX9	RX10	RX11	RX12	RX13
Wachstum bei:						
10° C	+	+	+	+	+	+
37° C	+	+	+	+	+	+
45° C	+	+	+	+	+	+
pH 9,6	+	+	+	+	+	+
Thermo-Toleranz						
60° C / 30 Min.	+	+	+	+	+	+
NaCl-Toleranz						
2,0%	+	+	+	+	+	+
4,0%	+	+	+	+	+	+
6,5%	+	+	+	+	+	+
Wachstum in:						
Galle 10%	+	+	+	+	+	+
Galle 40%	+	+	+	+	+	+
Methylenblau 0,1%	-	-	-	-	-	-
Methylenblau 0,01%	-	-	(+)	-	+	-
K-Tellurit 0,04%	-	-	-	-	-	-
Lackmusmilch	+	+	+	+	+	+
Hydrolyse von:						
Stärke	-	-	-	-	-	-
Na-Hippurat	-	-	-	-	-	-
Aesculin	+	+	+	+	+	+
Arginin	-	-	-	-	-	-
Hämolyse	-	-	-	-	-	-
Serol. Gruppe	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Erklärung: + = positive Reaktion
- = negative Reaktion
(+) = schwach positive Reaktion
ND = keine Angaben

Tab. 3: (Fortsetzung)

Tests	T1X40	T1X43	T1X94	T2X1	T2X103
Wachstum bei:					
10° C	+	+	-	+	+
37° C	+	+	+	+	+
45° C	(+)	(+)	+	+	+
pH 9,6	+	+	-	+	+
Thermo-Toleranz					
60° C / 30 Min.	+	+	+	+	+
NaCl-Toleranz					
2,0%	+	+	+	+	+
4,0%	+	+	+	+	+
6,5%	+	+	+	+	+
Wachstum in:					
Galle 10%	+	+	+	+	+
Galle 40%	+	+	+	+	+
Methylenblau 0,1%	-	-	-	-	-
Methylenblau 0,01%	+	-	(+)	-	-
K-Tellurit 0,04%	(+)	(+)	-	-	-
Lackmusmilch	-	-	+	+	+
Hydrolyse von:					
Stärke	-	-	-	-	-
Na-Hippurat	-	-	-	-	-
Aesculin	+	+	+	+	+
Arginin	-	-	-	-	-
Hämolyse	-	-	-	-	-
Serol. Gruppe	ND	ND	ND	ND	ND

Erklärung: + = positive Reaktion
- = negative Reaktion
(+) = schwach positive Reaktion
ND = keine Angaben

Tab. 3: (Fortsetzung)

Tests (T5 - Stämme)	X99	X100	X102	X118	X119	X120	X122
Wachstum bei:							
10° C	+	+	+	+	+	+	+
37° C	+	+	+	+	+	+	+
45° C	+	+	+	+	+	+	+
pH 9,6	+	+	+	+	+	+	+
Thermo-Toleranz							
60° C / 30 Min.	+	+	+	+	+	+	+
NaCl-Toleranz							
2,0%	+	+	+	+	+	+	+
4,0%	+	+	+	+	+	+	+
6,5%	+	+	+	+	+	+	+
Wachstum in:							
Galle 10%	+	+	+	+	+	+	+
Galle 40%	+	+	+	+	+	+	+
Methylenblau 0,1%	-	-	-	-	-	-	-
Methylenblau 0,01%	(+)	-	-	-	-	-	-
K-Tellurit 0,04%	-	-	-	-	-	-	-
Lackmusmilch	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolyse von:							
Stärke	-	-	-	-	-	-	-
Na-Hippurat	-	-	-	-	-	-	-
Aesculin	+	+	+	+	+	+	+
Arginin	-	-	-	-	-	-	-
Hämolyse	-	-	-	-	-	-	-
Serol. Gruppe	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Erklärung: + = positive Reaktion
- = negative Reaktion
(+) = schwach positive Reaktion
ND = keine Angaben

Tab. 4: Verwertung verschiedener C-Quellen

Tests	RX1	RX3	RX4	RX5	RX6	RX7
Aldosen						
L(+) Arabinose	+	+	+	+	+	+
D(+) Ribose	+	+	+	+	+	+
D(+) Xylose	-	-	-	-	-	-
D(+) Galactose	+	+	+	+	+	+
D(+) Glucose	+	+	+	+	+	+
D(+) Mannose	+	+	+	+	+	+
Ketosen						
D(-) Fructose	+	+	+	+	+	+
L(-) Sorbose	+	+	+	+	+	+
Desoxyzucker						
L(+) Rhamnose	+	+	+	+	+	+
Disaccharide						
Saccharose	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	+
Trisaccharide						
Raffinose	-	-	-	-	-	-
Polysaccharide						
Inulin	-	-	-	-	-	-
Zuckeralkohole						
Mannit	+	+	+	+	+	+
Sorbit	+	+	+	+	+	+
Dulcit	-	-	-	-	-	-
Xylit	+	+	+	+	+	+
meso-Inosit	-	-	-	-	-	-
Dreiwertige Alk.						
Glycerin	+	+	(+)	+	+	(+)
Zuckerderivate						
D-Glucosamin	+	+	+	+	+	+
α-Methylglucosid	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+

Erklärung: Vgl. Tabelle 3

Tab. 4: (Fortsetzung)

Tests	RX8	RX9	RX10	RX11	RX12	RX13
Aldosen						
L(+) Arabinose	+	+	+	+	+	+
D(+) Ribose	+	+	+	+	+	+
D(+) Xylose	-	-	-	-	-	-
D(+) Galactose	+	+	+	+	+	+
D(+) Glucose	+	+	+	+	+	+
D(+) Mannose	+	+	+	+	+	+
Ketosen						
D(-) Fructose	+	+	+	+	+	+
L(-) Sorbose	+	+	+	+	+	+
Desoxyzucker						
L(+) Rhamnose	+	+	-	+	-	+
Disaccharide						
Saccharose	+	+	-	+	-	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	(+)	-	(+)	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	+
Trisaccharide						
Raffinose	-	-	-	-	-	-
Polysaccharide						
Inulin	-	-	-	-	-	-
Zuckeralkohole						
Mannit	+	+	+	+	+	+
Sorbit	+	+	+	+	+	+
Dulcit	-	-	+	-	+	-
Xylit	+	+	+	+	+	+
meso-Inosit	-	-	-	-	-	-
Dreiwertige Alk.						
Glycerin	(+)	+	+	+	(+)	+
Zuckerderivate						
D-Glucosamin	+	+	+	+	+	+
α-Methylglucosid	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+

Erklärung: Vgl. Tabelle 3

Tab. 4: (Fortsetzung)

Tests	T1X40	T1X43	T1X94	T2X1	T2X103
Aldosen					
L(+) Arabinose	-	-	-	+	+
D(+) Ribose	+	+	-	+	+
D(+) Xylose	-	-	-	-	-
D(+) Galactose	+	+	+	+	+
D(+) Glucose	+	+	+	+	+
D(+) Mannose	+	+	+	+	+
Ketosen					
D(-) Fructose	+	+	+	+	+
L(-) Sorbose	+	+	-	+	+
Desoxyzucker					
L(+) Rhamnose	+	+	+	+	+
Disaccharide					
Saccharose	-	-	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	-	-
Cellobiose	+	+	-	+	+
Trisaccharide					
Raffinose	-	-	+	-	-
Polysaccharide					
Inulin	-	-	-	-	-
Zuckeralkohole					
Mannit	+	+	+	+	+
Sorbit	+	+	+	+	+
Dulcit	-	-	-	-	-
Xylit	+	+	+	+	+
meso-Inosit	-	-	-	-	-
Dreiwertige Alk.					
Glycerin	+	+	-	+	+
Zuckerderivate					
D-Glucosamin	+	+	+	+	+
α-Methylglucosid	+	+	-	+	+
Salicin	+	+	+	+	+

Erklärung: Vgl. Tabelle 3

Tab. 4: (Fortsetzung)

Tests (T5 - Stämme)	X99	X100	X102	X118	X119	X120	X122
Aldosen							
L(+) Arabinose	+	+	+	+	+	+	+
D(+) Ribose	+	+	+	+	+	+	+
D(+) Xylose	-	-	-	-	-	-	-
D(+) Galactose	+	+	+	+	+	+	+
D(+) Glucose	+	+	+	+	+	+	+
D(+) Mannose	+	+	+	+	+	+	+
Ketosen							
D(-) Fructose	+	+	+	+	+	+	+
L(-) Sorbose	+	+	+	+	+	+	+
Desoxyzucker							
L(+) Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+
Disaccharide							
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-	(+)	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+
Trisaccharide							
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-
Polysaccharide							
Inulin	-	-	-	-	-	-	-
Zuckeralkohole							
Mannit	+	+	+	+	+	+	+
Sorbit	+	+	+	+	+	+	+
Dulcit	+	+	+	+	+	+	+
Xylit	+	+	+	+	+	+	+
meso-Inosit	-	-	-	-	-	-	-
Dreiwertige Alk.							
Glycerin	+	+	+	(+)	+	+	+
Zuckerderivate							
D-Glucosamin	+	+	+	+	+	+	+
α-Methylglucosid	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+

Erklärung: Vgl. Tabelle 3

4.2.1 Einteilung der untersuchten Streptokokkenstämme in fünf Biotypen

Die Auswertung der vorliegenden Ergebnisse macht zunächst deutlich, daß sich die Mehrzahl der untersuchten Streptokokkenstämme lediglich in einigen Fermentationsreaktionen unterscheidet, während die Stämme T1X40, T1X43 und T1X94 darüberhinaus Abweichungen bei verschiedenen Resistenzeigenschaften zeigten.

Daneben läßt der Vergleich der Tabellen 3 und 4 erkennen, daß das Spektrum der positiven und negativen Eigenschaften bei einer bestimmten Anzahl von Stämmen jeweils völlig übereinstimmt. Eine taxonomisch unbedeutende Streuung der Ergebnisse war allein bei der Verwertung von Glycerin und beim Wachstum in 0,01% Methylenblaumilch zu verzeichnen. Diese Stämme konnten daher in Gruppen mit gleichem Reaktionsverhalten eingeteilt werden. Entsprechend sind die Vertreter einer Gruppe als einheitlicher Biotyp zu betrachten.

Die Gruppen die im folgenden mit A1 - A3 bezeichnet werden unterscheiden sich ausschließlich in der Verwertung verschiedener C-Quellen (vgl. Tab. 4). Hier konnten 21 der 24 Streptokokkenstämme eingeordnet werden.

Gruppe A1: T5X99, T5X100, T5X102, T5X118, T5X119, T5X120, T5X122;

Gruppe A2: RX1, RX3, RX4, RX5, RX6, RX7, RX8, RX9, RX11, RX13; T2X1, T2X103;

Gruppe A3: RX10, RX12;

Die beiden Stämme T2X1 und T2X103, die aus menschlicher Zahnplaque gewonnen wurden, sind aufgrund gleicher Charakteristika identisch mit der Mehrzahl der von Ratten isolierten

R-Stämme. Sie wurden zusammen mit diesen in die Gruppe A2 eingeteilt.

Die Gruppenunterschiede sind der Übersicht in der Tabelle 6 zu entnehmen.

Die Stämme T1X40 und T1X43 zeigen mit den eben genannten Gruppen weitgehende Übereinstimmung. Kennzeichnend für diese Organismen ist jedoch - im Gegensatz zu allen anderen Stämmen - ein, wenn auch schwaches, Wachstum in Medien mit 0,04% K-Tellurit. Ebenso ist bei beiden Stämmen in Lackmusmilch weder Säurebildung noch Gerinnung festzustellen.

Obwohl diese Merkmale für die systematische Einordnung von untergeordneter Bedeutung sind können sie dennoch als ausreichend für eine Abgrenzung der beiden Stämme von den Gruppen A1 - A3 angesehen werden: entsprechend werden die Stämme T1X40 und T1X43 im folgenden mit B bezeichnet.

Gruppe B: T1X40, T1X43;

Der Stamm T1X94 unterscheidet sich als einziger in wesentlichen physiologischen Merkmalen: kein Wachstum bei 10° C und kein Wachstum bei pH 9,6. Diese Eigenschaften markieren eine deutliche Abgrenzung von allen bisher genannten Stämmen, sodaß eine gesonderte Stellung dieses Stammes gerechtfertigt erscheint.

Gruppe C: T1X94

Wie die Aufstellung zeigt, konnten aus den 24 Streptokokkenstämmen fünf Gruppen bzw. Biotypen unterschieden werden.

Die Tabellen 5 und 6 sind als Zusammenfassung der Tabellen 3 und 4 zu betrachten, wobei die Merkmalsgruppen eines Biotyps - bezogen auf einen Test - als jeweils ein Wert in die Tabellen übernommen wurden.

Tab. 5: Einteilung der 24 Streptokokkenstämme in 5 Biotypen Resistenz-, Hydrolyse- und Hämolyseeigenschaften (bezogen auf die Ergebnisse aus Tabelle 3)

Tests	A1	A2	A3	B	C
Wachstum bei:					
10° C	+	+	+	+	-
37° C	+	+	+	+	+
45° C	+	+	+	+	+
pH 9,6	+	+	+	+	-
Thermo-Toleranz					
60° C / 30 Min.	+	+	+	+	+
NaCl-Toleranz					
2,0%	+	+	+	+	+
4,0%	+	+	+	+	+
6,5%	+	+	+	+	+
Wachstum in:					
Galle 10%	+	+	+	+	+
Galle 40%	+	+	+	+	+
Methylenblau 0,1%	-	-	-	-	-
Methylenblau 0,01%	-	d	+	d	+
K-Tellurit 0,04%	-	-	-	(+)	-
Lackmusmilch	+	+	+	-	+
Hydrolyse von:					
Stärke	-	-	-	-	-
Na-Hippurat	-	-	-	-	-
Aesculin	+	+	+	+	+
Arginin	-	-	-	-	-
Hämolyse	-	-	-	-	-
Serol. Gruppe	ND	ND	ND	ND	ND

Erklärung:
+ = positive Reaktion
- = negative Reaktion
(+) = schwach positive Reaktion
d = unterschiedliche Reaktionen
ND = keine Angaben

Tab. 6: Einteilung der 24 Streptokokkenstämme in 5 Biotypen
Verwertung verschiedener C-Quellen
(bezogen auf die Ergebnisse aus Tabelle 4)

Tests	A1	A2	A3	B	C
Aldosen					
L(+) Arabinose	+	+	+	–	–
D(+) Ribose	+	+	+	+	–
D(+) Xylose	–	–	–	–	–
D(+) Galactose	+	+	+	+	+
D(+) Glucose	+	+	+	+	+
D(+) Mannose	+	+	+	+	+
Ketosen					
D(–) Fructose	+	+	+	+	+
L(–) Sorbose	+	+	+	+	–
Desoxyzucker					
L(+) Rhamnose	+	+	–	+	+
Disaccharide					
Saccharose	+	+	–	–	+
Maltose	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+
Melibiose	–	–	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	–
Trisaccharide					
Raffinose	–	–	–	–	+
Polysaccharide					
Inulin	–	–	–	–	–
Zuckeralkohole					
Mannit	+	+	+	+	+
Sorbit	+	+	+	+	+
Dulcit	+	–	+	–	–
Xylit	+	+	+	+	+
meso-Inosit	–	–	–	–	–
Dreiwertige Alk.					
Glycerin	+	d	d	+	–
Zuckerderivate					
D-Glucosamin	+	+	+	+	+
α-Methylglucosid	+	+	+	+	–
Salicin	+	+	+	+	+

Erklärung: vgl. Tabelle 5

4.2.2 Charakterisierung der Streptokokkenstämme

Sämtliche untersuchten Stämme sind morphologisch einheitlich. Sie zeigen die für Streptokokken charakteristische Anordnung der Zellen in Paaren oder Ketten unterschiedlicher Länge sowie GRAM-positive Reaktion (vgl. 4.1.1). Der Durchmesser der Zellen beträgt etwa 0,8 μ, wie aus der elektronenoptischen Aufnahme (Abb. 1) hervorgeht.

Auf einem xylithaltigen Festmedium (Bacto Phenol Red Agar Base + 1% Xylit) bilden alle Stämme nach 1-tägigem Wachstum kreisförmige, semitransparente Einzelkolonien mit einem Durchmesser von annähernd 0,2 bis o,9 mm (vgl. 4.1.1).

Alle Stämme sind fakultativ anaerob, chemoorganotroph. Sie verwerten gleichermaßen unter aeroben wie unter anaeroben Bedingungen ein breites Spektrum unterschiedlicher C-Qellen: Aldosen, Ketosen, Desoxyzucker sowie Disaccharide. Ferner Zuckeralkohole, darunter die Saccharose-Austauschstoffe Mannit, Sorbit und Xylit. Ebenso werden der dreiwertige Alkohol Glycerin sowie die Zuckerderivate D-Glucosamin, α-Methylglucosid und Salicin unter Bildung von Säure abgebaut. Nur ein Stamm (T1X94) verwertet das Trisaccharid Raffinose. Alle weiteren untersuchten Stämme metabolisieren weder Raffinose noch das Polysaccharid Inulin.

Die Verwertung der genannten C-Quellen ist in den Tabellen 4 und 6 zusammenfassend dargestellt.

Die elektrometrisch ermittelten End-pH-Werte, nach 48 Stunden aerobem Wachstum der Kulturen in einem flüssigen Nährmedium (Bacto Phenol Red Broth Base + 1% Kohlenhydrat) bei 37° C, erreichten bei Glucose Werte von pH 3,79 und bei Fructose pH 3,85. Dabei konnte übereinstimmend mit den Ergebnissen von ELIAS (1976) festgestellt werden, daß, im Gegensatz zur starken Säurebildung aus Glucose und Fructose, Säure aus Saccha-

rose nur in geringeren Mengen gebildet wurde. Die End-pH-Werte lagen hier zwischen 6,10 (RX10, RX12) und 5,02 bzw. 4,97 (RX3, RX5). Allein der Stamm T1X94 erreichte bei der Verwertung von Saccharose einen End-pH-Wert von 4,32.

Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß den betreffenden Streptokokkenstämmen, die zwar Glucose und Fructose umsetzen, nicht dagegen Saccharose, das Enzym β-Fructofuranosidase völlig fehlt, oder daß es primär nur in inaktiver Form vorliegt (GEHRING und GÜLZOW 1977). "Der geringe meßbare Abbau läßt sich möglicherweise mit der Verwertung der Spaltprodukte Glucose und Fructose erklären" (ELIAS 1976), die aufgrund der Hydrolyse im Nährmedium auftreten können.

Die Säurebildung aus Xylit war im Vergleich mit der aus Glucose und Fructose schwächer. Die End-pH-Werte lagen für die R-Stämme (Biotypen A2 und A3) einheitlich bei 4,9; für die T-Stämme (Biotypen A1 und C) bei 4,6. Der Biotyp B erreichte einen End-pH-Wert von 5,1 beim Abbau von Xylit.

Der Vergleich der Resistenz-, Hydrolyse- und Hämolyseeigenschaften macht erneut das einheitliche Reaktionsverhalten der 24 Streptokokkenisolate deutlich.

Hervorzuheben sind besonders:

(1) die Toleranz gegenüber Schwankungen des pH-Wertes: sämtliche Kulturen, die in ein auf pH 9,6 eingestelltes flüssiges Nährmedium (Phenol Red Broth Base + 1% Glucose) überimpft und und bei 37° C bebrütet wurden, zeigten bereits nach einem Tag kräftiges Wachstum. Der nach zwei Tagen ermittelte pH-Wert lag bei Glucose im Bereich von pH 3,8. Als Ausnahme ist hier lediglich der Stamm T1X94 zu nennen, der bei pH 9,6 kein Wachstum zeigte. Auf das abweichende Reaktionsverhalten dieses Stammes wurde bereits an anderer Stelle hingewiesen (vgl. 4.2.1).

(2) die Thermotoleranz liegt im Bereich zwischen 10° C und 45° C. Alle Kulturen, die in einem flüssigen Nährmedium (Phenol Red Broth Base + 1% Glucose) bei 45° C bebrütet wurden, ließen bereits nach einem Tag kräftiges Wachstum am Umschlag des pH-Indikators Phenolrot sowie durch Trübung der Nährlösung erkennen. Die End-pH-Werte, gemessen nach zwei Tagen, lagen mit annähernd pH 4,0 nur geringfügig über den Werten, die bei dem Temperaturoptimum von 37° C von den Kulturen in einem Glucose-haltigen Nährmedium erreicht wurden (pH 3,8).

Verzögertes Wachstum war bei einem Teil der Kulturen während der Bebrütung bei 10° C festzustellen. Erst nach vier Tagen zeigten der Indikatorumschlag von Rot nach Gelb sowie die Trübung der Nährlösung eindeutig das Wachstum sämtlicher getester Stämme, mit Ausnahme des Stammes T1X94 (vgl. 4.2.1). Die nach sieben Tagen ermittelten End-pH-Werte lagen im Bereich von 4,2 bis 4,9.

(3) Sämtliche Kulturen überlebten eine Erhitzung auf 60° C für 30 Minuten und sind

(4) resistent gegen eine NaCl Konzentration von 6,5%.

(5) Wachstum in Nährmedien mit Zusatz von 40% Galle konnte einheitlich bei allen Kulturen festgestellt werden.

(6) Kein Wachstum erfolgte dagegen in o,1% Methylenblaumilch sowie

(7) in Nährmedien mit einem Zusatz von 0,04% K-Tellurit. Lediglich die Stämme T1X40 und T1X43 konnten auf einem entsprechenden Festmedium unter Ausbildung von kleinen Kolonien wachsen.

(8) Arginin konnte von keinem der Stämme hydrolysiert werden.

(9) Hämolyse wurde bei keinem der Stämme festgestellt.

(10) Die Stämme sind serologisch nicht eingruppierbar.

4.2.3 Identifizierung der Streptokokkenstämme

Mit Hilfe der vorliegenden Ergebnisse läßt sich bei sämtlichen untersuchten Streptokokkenstämmen ein für Enterokokken typisches Reaktionsspektrum erkennen.

Zur weiteren Identifizierung wurden daher die Charakteristika von bekannten Enterokokken-Arten sowie von enterokokkenähnlichen Arten mit den Merkmalen der untersuchten Stämme verglichen und geprüft, mit welchen dieser Referenzstämme die untersuchten Stämme identisch sind oder am weitesten übereinstimmen.
Ebenso wurden die Spezies S. mutans, S. salivarius und S. milleri zum Vergleich herangezogen: Keime, die in der Mundhöhle des Menschen vorkommen und nach einer Reihe von neueren Untersuchungen für die Kariesätiologie von Bedeutung sind.

In der Tabelle 7 sind die Identifizierungs- und Differenzierungsmerkmale der untersuchten Streptokokkenstämme, entsprechend deren Einteilung in fünf Biotypen (vgl. 4.2.1), im Vergleich mit den Eigenschaften der Referenzstämme dargestellt.

Zur Systematik der Streptokokken wurden folgende Literaturquellen herangezogen:
BAILEY and SCOTT (1970); BERGEY (1974); COLMAN and WILLIAMS (1972, 1973); COWAN and STEEL (1974); DEIBEL et al. (1963); DEIBEL (1964); DENT et al. (1978); EDWARDSSON (1968); FACKLAM (1972); GIBBS and SKINNER (1966); HAHN et al. (1970); HARTMAN et al. (1966); LENNETTE et al. (1974); MAC FADDIN (1976);

MEJARE and EDWARDSSON (1975); MERCK, (1972); NOWLAN and DEIBEL (1967); PLECEAS (1970); SKINNER and CARR (1974); SMITH and SHATTOCK (1964).

Wich bei einem Autor ein Merkmal von den Angaben der anderen Autoren ab, so wurde diese Abweichung als atypisch vernachlässigt. Lagen hingegen mehrere unterschiedliche Angaben bei einem Merkmal vor, so wurde dieses in der Tabelle mit einem "v" (variabel) vermerkt. Fehlende Angaben wurden durch einen Punkt gekennzeichnet.

Zur besseren Übersicht wurden nur solche Werte aus eigenen Untersuchungen übernommen, für die in der Literatur Vergleichswerte gefunden werden konnten.

Tab. 7: Identifizierungs- und Differenzierungsmerkmale der untersuchten Streptokokkenstämme im Vergleich mit den Eigenschaften der Referenzstämme, dargestellt an fünf Biotypen

		Wachstum bei/in									Verwertung von C-Quellen																				Hydrolyse			
	Serol. Gruppe	Hämolyse	10 °C	45 °C	pH 9,6	60 °C/30 Min.	NaCl 6,5%	Galle 40%	Methylenblau O,1%	K-Tellurit O,04%	L(+)Arabinose	D(+)Xylose	D(+)Galactose	D(+)Glucose	D(+)Mannose	D(-)Fructose	L(-)Sorbose	Saccharose	Maltose	Lactose	Trehalose	Melibiose	Cellobiose	Raffinose	Inulin	Mannit	Sorbit	Xylit	Glycerin	Salicin	Stärke	Na-Hippurat	Aesculin	Arginin
S. faecalis	D	γ	+	+	+	+	+	+	+	+	-	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	.	+	+	-	+	+	+
S. faecium	D	α	+	+	+	+	+	+	+	-	+	.	+	+	.	+	.	+	+	+	+	+	v	-	+	-	.	-	+	-	+	v	+	+
S. durans	D	α/ß	+	+	+	+	+	+	+	-	-	.	.	+	.	.	.	-	.	+	v	-	.	-	-	-	-	.	-	v	-	v	+	+
S. bovis	D	α/γ	-	+	-	+	-	+	-	-	d	v	+	+	+	+	.	+	+	+	d	+	.	+	d	d	-	.	-	+	+	-	+	-
S. equinus	D	α/γ	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	.	+	.	+	+	-	v	-	.	-	-	-	-	.	-	+	+	-	+	-
S. uberis	E	α/γ	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	.	+	.	+	.	+	+	+	+	-	.	-	+	+	+	.	v	+	v	+	+	+
S. avium	D/Q	α/γ	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	-	+	+	+	+	+	.	-	-	+	-
Biotyp A 1	-	γ	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Biotyp A 2	-	γ	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	d	+	-	-	+	-
Biotyp A 3	-	γ	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	d	+	-	-	+	-
Biotyp B	-	γ	+	+	+	+	+	+	-	-(+)	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Biotyp C	-	γ	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
S. mutans	-	γ	.	-	.	.	-	v	-	-	.	.	.	+	.	.	.	+	+	+	+	.	.	+	v	+	+	.	-	+	v	-	+	-
S. salivarius	-	γ	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	.	+	.	.	.	+	+	+	+	.	.	+	+	-	-	.	-	+	-	-	+	-
S. milleri	-	α/γ	.	+	-	.	-	+	-	-	.	.	.	+	.	.	.	+	+	+	+	.	.	.	-	-	-	.	-	+	-	-	+	+

V = variabel; weitere Symbole vgl. Tab. 5

Tabelle 7 ist zu entnehmen, daß die Biotypen A1, A2 und A3 sowie der Biotyp B und damit 23 der 24 xylitabbauenden Streptokokkenstämme, als Vertreter der Art S. avium zu betrachten sind.

Diese Spezies, die nach einem Vorschlag von NOWLAN and DEIBEL (1967) den Enterokokken zugeordnet wird, gehört serologisch zur LANCEFIELD-Streptokokken-Gruppe Q.

Bei den untersuchten Streptokokkenstämmen konnte das Gruppenantigen Q jedoch nicht festgestellt werden (vgl.4.2). Entsprechende Untersuchungen zeigten aber, daß bei nahezu der Hälfte der Gruppe-Q-Streptokokken das gruppenspezifische Antigen offenbar fehlt (NOWLAN and DEIBEL 1967). Das für Enterokokken typische Gruppe-D-Antigen, welches bei der Mehrzahl der Gruppe-Q-Streptokokken zusätzlich vorhanden ist (BERGEY 1974) war ebenfalls nicht nachzuweisen (vgl. 4.2). Doch ist dies möglicherweise darauf zurückzuführen, daß die Gruppe-D-Reaktionen bei S. avium "sehr schwach sind und mehr als die üblichen 30 Minuten zur Entwicklung benötigen", wie aus einer Arbeit von FACKLAM (1971) hervorgeht.

Dennoch können die xylitabbauenden Keime aufgrund der hohen Übereinstimmung ihrer Merkmale im gesamten Leistungsspektrum in der serologischen Gruppe Q plaziert und als S. avium identifiziert werden, obwohl dies mit serologischen Verfahren nicht möglich ist.

Insbesondere bestätigen die für diese Spezies charakteristischen Resistenzeigenschaften die Einordnung: so kann S. avium und, wie gezeigt werden konnte, auch die oben genannten Biotypen noch bei 10° C und bei 45° C wachsen; ebenso bei pH 9,6, in Gegenwart von 6,5% NaCl und 40% Galle; und sie überleben eine Erhitzung auf 60° C für 30 Minuten. Dies sind die klassischen Merkmale, die nach SHERMAN (1938) die Grundlage der Enterokokken-Differenzierung innerhalb der

Gattung Streptococcus darstellen. Dennoch kann S. avium von anderen Enterokokken -besonders von S. faecalis und S.faecium- dadurch unterschieden werden, daß diese Art nicht fähig ist, in 0,1% Methylenblaumilch zu wachsen oder Arginin zu hydrolysieren. Ein weiteres Merkmal, welches S. avium von den meisten Streptokokken-Spezies unterscheidet, ist die Fermentation von Sorbose (NOWLAN and DEIBEL 1967). Daneben kann die Verwertung von Xylit als wesentliches Kriterium zur Identifizierung der untersuchten Keime gewertet werden, da die Streptokokkengruppe Q "als einzige der bekannten serologischen Streptokokkengruppen A bis S ebenfalls zu einem positiven Xylitabbau fähig ist" (GEHRING 1971).

Der Vergleich der einzelnen Biotypen mit den Charakteristika von S. avium macht deutlich, daß Abweichungen lediglich in der Verwertung solcher C-Quellen auftreten, die taxonomisch von untergeordneter Bedeutung sind: so werden Xylose und Inulin als einziges Substrat von keinem der Stämme fermentiert, Saccharose nur von den Biotypen A1 und A2. Die Fähigkeit Arabinose zu verwerten fehlt ausschließlich Biotyp B. Daneben zeigt dieser Biotyp als einziger der unter S. avium eingeordneten Stämme eine Abweichung im Resistenzverhalten und zwar ein schwaches Wachstum in Gegenwart von K-Tellurit (vgl. 4.2.1): doch kann dies nicht als ausreichend für eine Abgrenzung von S. avium angesehen werden, da auch Biotyp B in allen wesentlichen Merkmalen mit der Physiologie dieses Referenzstammes übereinstimmt.

Anders sind die Eigenschaften von Biotyp C, dem Streptokokkenstamm T1X94, hinsichtlich der Taxonomie zu bewerten. Von S. avium unterscheidet sich dieser Stamm grundlegend dadurch, daß er nicht bei 10 ^{o} C und nicht unter alkalischen Bedingungen bei pH 9,6 wächst. Ebenso wird Sorbose nicht fermentiert. Die meisten Übereinstimmungen lassen sich dagegen beim Vergleich der Merkmale mit S. bovis erkennen. Besonders das Fermentationsmuster ist mit Ausnahme der Sorbitverwertung

identisch. Ebenso besteht in den Resistenzeigenschaften eine hohe Similarität zwischen Biotyp C und S. bovis. Doch ist zu beachten, daß diese Art in der Literatur meist als nicht resistent gegenüber 6,5% NaCl beschrieben wird.

S. bovis wird serologisch der Streptokokkengruppe D zugeordnet. Das entsprechende Gruppenantigen konnte jedoch bei Biotyp C nicht nachgewiesen werden (vgl. 4.2). Auch FACKLAM (1971) hat in einer Untersuchung zwei Stämme isoliert, die das typische Reaktionsspektrum von S. bovis zeigten, aber nicht mit dem Gruppe-D-Antiserum reagierten.

Die Hydrolyse von Stärke, eine charakteristische Eigenschaft von S. bovis, ist bei Biotyp C nicht vertreten. Auf das Vorkommen von S. bovis-ähnlichen Varianten, die ebenfalls nicht die Fähigkeit besitzen Stärke zu hydrolysieren, wird von FACKLAM (1971) hingewiesen.

Die Abgrenzung von Biotyp C gegenüber den Referenzstämmen wird bei S. equinus deutlich im Abbau von Lactose und Raffinose. Von den Enterokokken S. faecalis, S. faecium und S. durans ist er durch abweichende Resistenz- und Hydrolyseeigenschaften abgegrenzt. S. uberis zeigt ein völlig verschiedenes Reaktionsmuster. Ebenso zeigen die zum Vergleich mit angeführten Keime S. mutans, S. salivarius und S. milleri keine Übereinstimmung in wesentlichen Merkmalen.

Damit kann Biotyp C bzw. der Streptokokkenstamm T1X94 als S. bovis-Variante klassifiziert werden, welche Stärke nicht hydrolysiert und resistent ist gegen 6,5% Kochsalz. Der Nachweis extrazellulär gebildeter Polysaccharide in Saccharoselösung, ein Merkmal, das bei der Mehrzahl der S. bovis-Stämme zu finden ist, sollte Gegenstand einer weiteren Untersuchung sein.

4.3 Charakterisierung und Identifizierung des Stammes RX2

4.3.1 Charakterisierung des Stammes RX2

Bei diesem GRAM-negativen Keim handelt es sich um gerade, bewegliche Stäbchen, mit einer Länge von 2 und einem Durchmesser von etwa 0,8μ, wie aus den elektronenoptischen Aufnahmen (Abb. 4 und 5) hervorgeht. Lateral inserieren Geißeln (Abb. 4); während der Wachstumsphase finden sich peritrich zahlreiche Fimbrien (Abb. 5). Kapsel oder Sporenbildung sind nicht festzustellen. Pigment wird nicht gebildet.

Auf soliden Agaroberflächen (Bacto Phenol Red Agar Base + 1% Xylit) breiten sich die Organismen langsam und diffus aus, jedoch ohne ausgeprägte Tendenz zum "Schwärmen".

Weitere Angaben zur Morphologie des Stammes RX2 finden sich in Abschnitt 4.1.1. Die physiologischen Hauptmerkmale sind in Abschnitt 4.1.3 beschrieben.

Der fakultativ anaerobe, chemoorganotrophe Keim verwertet aus dem Spektrum der angebotenen Kohlenhydrate vorwiegend Monosaccharide, und zwar die Aldosen Glucose, Mannose, Galactose und Ribose; ferner die Ketosen Fructose und Sorbose. Ebenso werden die Zuckeralkohole Xylit und das strukturell fast gleichartige Adonit sowie der Aminozucker D-Glucosamin unter Bildung von Säure abgebaut. Die End-pH-Werte, gemessen nach 48-stündigem aerobem Wachstum in einem flüssigen Nährmedium (Phenol Red Broth Base + 1% Kohlenhydrat) bei 37° C, lagen bei den Monosacchariden einheitlich im Bereich von pH 4,8. Die Säurebildung aus dem Saccharose-Austauschstoff Xylit war dagegen mit pH 5,3 vergleichsweise schwach.

Bei der Fermentation von Glucose entstehen geringe Mengen Gas. Oligosaccharide und das Polysaccharid Inulin werden ebenso wie die angebotenen Glykoside, darunter Aesculin,

nicht gespalten. Offenbar fehlen diesem xylitabbauenden Keim die Enzyme, welche die Hydrolyse der Oligosaccharide und Glykoside katalysieren, die Glykosidasen, eine Untergruppe der Hydrolasen (KARLSON 1974).

Neben diesen fermentativen Eigenschaften ist der Stamm RX2 durch den Aminosäure-Stoffwechsel besonders gekennzeichnet. Hervorzuheben sind die Desaminierung von Phenylalanin zu Phenylpyruvat und die positive Ornithindecarboxylierung. Ebenso besitzt der Keim die Fähigkeit, aus der Aminosäure Tryptophan Indol abzuspalten.
Weitere Merkmale sind die Hydrolyse von Harnstoff (Urease positiv) sowie die Resistenz gegenüber KCN. Die H_2S-Bildung im SIM-Medium ist negativ. Geringe Mengen Schwefelwasserstoff konnten lediglich mit Bleiazetatstreifen nachgewiesen werden. Doch ist diese Reaktion so empfindlich (COSTIN 1969, COWAN and STEEL 1974), daß die Bildung von H_2S als negativ gewertet werden muß. Nitrate werden nicht zu Nitriten reduziert. Acetylmethylcarbinol wird nicht gebildet (VOGES-PROSKAUER-Reaktion negativ).

Daneben verfügt dieser Keim über Eigenschaften, die für die Klassifizierung der Enterobacteriaceen zwar von untergeordneter Bedeutung sind, aber dennoch zur Charakterisierung beitragen. So wächst der Keim in Medien mit 10% und 40% Galle, in 6,5% Kochsalz und in Medien, die auf einen Initial-pH von 9,6 eingestellt sind. Die besten Wachstumsbedingungen liegen bei einer Temperatur von 37° C. Das Wachstum bei 10° C ist schwach und bei 45° C negativ. Hämolyse auf Blutagar ist nicht festzustellen.

Die biochemischen Merkmale des Stammes RX2 sind, mit Ausnahme der zuletzt genannten, in der Tabelle 9 zusammenfassend dargestellt.

4.3.2 Identifizierung des Stammes RX2

Nach allgemeinen morphologischen und physiologischen Hauptmerkmalen konnte dieser Stamm bereits in die Familie der Enterobacteriaceen eingeordnet werden (vgl. 4.1.3).

Diagnostisch sind noch folgende Bakteriengruppen in Betracht zu ziehen: Pseudomonas, Aeromonas, Vibrio, Alcaligenes und Flavobakterien. Sie unterscheiden sich jedoch von den Enterobacteriaceen durch den positiven Cytochromoxydase-Test (EWING et al. 1961).

Zur weiteren Differenzierung werden in Tabelle 8 die Eigenschaften des Stammes RX2 mit dem biochemischen Verhalten typischer Enterobakterien verglichen. Dabei sind nach EDWARDS and EWING (1972) die Gattungen der Enterobacteriaceen-Familie in Gruppen mit gemeinsamen Hauptmerkmalen zusammengefaßt.

Aus Tabelle 8 geht hervor, daß der Stamm RX2 in die Proteus-Gruppe eingeordnet werden kann.

Besonders die Fähigkeit, Phenylalanin zu desaminieren, ein typisches Merkmal, das die Proteus-Gruppe von allen anderen Vertretern der Enterobacteriaceen-Familie unterscheidet (BERGEY 1974), bestätigt die Einordnung.

Daneben ist die Abgrenzung des Stammes RX2 von den übrigen Gruppen durch weitere biochemische Nachweisreaktionen gesichert: so unterscheidet sich der xylitabbauende Keim in der Hydrolysierung von Harnstoff (Urease positiv) sowie in der Resistenz gegenüber KCN eindeutig von den Gruppen 1, 2 und 3; KCN-positiv in Gruppe 3 ist alleine Citrobacter. Die Bildung von H_2S bei sämtlichen Vertretern der Gruppen 2 und 3 ist ein weiteres Unterscheidungsmerkmal; ebenso der positive VOGES-PROSKAUER-Test bei Gruppe 4. Charakteristisch für die Salmonella- und Klebsiella-Gruppe ist die Verwertung von Citrat als alleinige Kohlenstoffquelle, doch fehlt diesen

Organismen, im Gegensatz zum Stamm RX2, die Fähigkeit zur Indolbildung.

Die Gattung Proteus wird nach der Klassifizierung von RUSTIGIAN and STUART (1945) in vier Arten unterteilt: P. vulgaris, P. mirabilis, P. morganii und P. rettgeri.

Eine Gruppe von Proteus-ähnlichen Bakterien wurde von STUART et al. (1946) beschrieben und von SHAW and CLARKE (1955) als Providencia-Gruppe bzw. Proteus inconstans Typ A und B direkt in die Gattung Proteus eingeordnet. Doch wird diese Klassifizierung, die auch in BERGEY's Manual (1974) übernommen wurde, nicht allgemein anerkannt (BERGEY 1974). In einer Veröffentlichung von EWING (1962) wird Proteus inconstans als selbständige Gattung Providencia beschrieben und in die beiden Spezies Providencia alcalifaciens und Providencia stuartii eingeteilt.

Da diese Einteilung heute in der Mehrzahl mikrobiologischer Handbücher Anwendung findet - so in COWAN and STEEL (1974), EDWARDS and EWING (1972), LENNETTE et al. (1974), MAC FADDIN (1976) - wurde in der vorliegenden Arbeit darauf Bezug genommen.

Zur Bestimmung der Spezies innerhalb der Proteus-Gruppe sind in Tabelle 9 die biochemischen Merkmale des Stammes RX2 im Vergleich mit den Eigenschaften der Proteus- und Providencia-Arten aufgeführt. Die Charakteristika dieser Referenzstämme wurden der oben genannten Literatur entnommen.

Tab. 8: Differenzierungsmerkmale des Stammes RX2 im Vergleich mit den Eigenschaften der Enterobacteriaceen-Gruppen

Tests	1	2	3	4	5	6
H_2S-Bildung	-	+	+	-	+/-	-
Urease (Christensen)	-	-	-	-/+	+/-	+
Indolbildung	+/-	+	-	-	+/-	+
Voges-Proskauer-Test	-	-	-	+	-	-
Citrat (Simmons')	-	-	+	+	d	-
KCN-Resistenz	-	-	-/+	+	+	+
Phenylalanindesaminase	-	-	-	-	+	+
Mannitabbau	+/-	-	+	+	-/+	-

1 Escherichia -Gruppe (Shigella, Escherichia)
2 Edwardsiella-Gruppe (Edwardsiella spp.)
3 Salmonella -Gruppe (Salmonella, Arizona, Citrobacter)
4 Klebsiella -Gruppe (Klebsiella, Enterob.,Hafnia, Serratia)
5 Proteus -Gruppe (Proteus einschl. Providencia-Gruppe)

6 Stamm RX2 (Xylit abbauender Enterobacteriaceen-Stamm)

Angaben über Vergleichsorganismen nach COSTIN (1965, 1969) und EDWARDS and EWING (1972).

Erklärung: + = mehr als 90% der Stämme positiv
- = mehr als 90% der Stämme negativ
d = 11 bis 89% der Stämme positiv
+/- = Mehrheit der Stämme positiv
-/+ = Mehrheit der Stämme negativ

Tab. 9: Identifizierungs- und Differenzierungsmerkmale des Stammes RX2 im Vergleich mit den Eigenschaften der Proteus- und Providencia-Spezies

Tests	1	2	3	4	5	6	7
H_2S-Bildung	-	-	-	+	+	-	-
Urease (Christensen)	+	+	+	+	+	-	-
Indolbildung	+	+	+	+	-	+	+
Voges-Proskauer-Test	-	-	-	-	-/+	-	-
Citrat (Simmons')	-	-	+	d	d	+	+
Malonat	-	-	-	-	-	-	-
KCN-Resistenz	+	+	+	+	+	+	+
Gelatinase	-	-	-	+	+	-	-
Aesculin (Hydrolyse)	-	-	d	d	-	-	-
Lysindecarboxylase	-	-	-	-	-	-	-
Arginindihydrolase	-	-	-	-	-	-	-
Ornithindecarboxylase	+	+	-	-	+	-	-
Phenylalanindesaminase	+	+	+	+	+	+	+
Nitratreduktion	-	+/-	+	+	+	.	.
Oxidation/Fermentation	F	F	F	F	F	F	F
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-
Cetrimid (Wachstum)	-	-	-	-	-	.	.
Motilität	+	+/-	+	+	+	+	+/-

1 Stamm RX2
2 Proteus morganii
3 Proteus rettgeri
4 Proteus vulgaris
5 Proteus mirabilis
6 Providencia alcalifaciens
7 Providencia stuartii

Angaben über Vergleichsorganismen nach COWAN and Steel (1974) sowie EDWARDS and EWING (1972).
Erklärung: F = Fermentation; weitere Symbole vgl. Tab 8.

Tab. 9: (Fortsetzung) Verwertung verschiedener C-Quellen

Tests	1	2	3	4	5	6	7
L(+) Arabinose	–	–	–	–	–	–	–
D(+) Ribose	+	.	.	.	.	.	.
D(+) Xylose	–	–	–/+	+	+	–	–
D(+) Galactose	+	+	+	+	+	+	+
D(+) Glucose	+	+	+	+	+	+	+
D(+) Mannose	+	+	+	–	–	+	+
D(–) Fructose	+	+	+	+	+	+	+
L(–) Sorbose	+	.	.	.	.	.	.
L(+) Rhamnose	–	–	d	–	–	–	–
Saccharose	–	–	d	+	d	d	d
Maltose	–	–	–	+	–	–	–
Lactose	–	–	–	–	–	–	–
Trehalose	–	–/+	d	d	+	–	d
Melibiose	–	–	–	–	–	–	–
Cellobiose	–	–	d	d	d	–	d
Raffinose	–	–	–	–	–	–	–
Inulin	–	–	–	–	–	–	–
Mannit	–	–	+	–	–	–	–
Sorbit	–	–	–	–	–	–	d
Dulcit	–	–	–	–	–	–	–
Xylit	+	.	.	.	.	.	.
Adonit	+	–	d	–	–	+	–
meso-Inosit	–	–	+	–	–	–	+
Glycerin	–	d	+	+	+	d	d
D-Glucosamin	+	.	.	.	.	.	.
α-Methylglucosid	–	–	–	d	–	.	.
Salicin	–	–	d	d	d	–	–

1 Stamm RX2
2 Proteus morganii
3 Proteus rettgeri
4 Proteus vulgaris
5 Proteus mirabilis
6 Providencia alcalifaciens
7 Providencia stuartii

Angaben über Vergleichsorganismen nach BERGEY (1974), COWAN and STEEL (1974), EDWARDS and EWING (1972).

Erklärung: vgl. Tab. 8

Wie aus Tabelle 9 hervorgeht ergibt der Vergleich der verschiedenen Reaktionsmuster die größte Similarität zwischen dem Stamm RX2 und Proteus morganii.

Die Fähigkeit zur Nitratreduktion, ein gemeinsames Merkmal der Gattung Proteus, und charakteristisch für die gesamte Enterobacteriaceen-Familie (BERGEY 1974), ist bei dem untersuchten Stamm nicht nachzuweisen. Dennoch kann die taxonomische Stellung dieses Keimes innerhalb der Enterobacteriaceen-Familie durch den hohen Grad an Übereinstimmung in allen weiteren phänotypischen Eigenschaften als gesichert gelten. Auch ist, wie aus einer Veröffentlichung von EWING et al. (1960 a) hervorgeht, besonders Proteus morganii in Bezug auf dieses Merkmal variabel; denn 11,5% der von EWING untersuchten P. morganii-Kulturen waren ebenfalls nicht zu einer positiven Nitratreduktion fähig.

Die einzige Abweichung im biochemischen Verhalten ist somit der positive Adonit-Abbau, der jedoch für die Taxonomie von untergeordneter Bedeutung ist. Über die Verwertung des Saccharose-Austauschstoffes Xylit, der sich in seiner chemischen Struktur von Adonit kaum unterscheidet, liegen für die Referenzstämme keine vergleichbaren Untersuchungen vor.

Die Differenzierung des Stammes RX2 von zwei typischen Vertretern der Gattung Proteus, P. vulgaris und P. mirabilis, wird deutlich allein aufgrund morphologischer Kriterien: so zeigen diese beiden Spezies eine ausgeprägte Tendenz zum spontanen "Schwärmen" auf soliden Nährmedien: die Oberfläche ist bedeckt mit einer dünnen Schicht von Zellen, die sich in einer wechselnden Anordnung von Wirbeln und Bändern über den Agar bewegen. Während dieser Phase sind die Bakterienzellen peritrich mit einer außergewöhnlich großen Zahl von Geißeln umgeben (BERGEY 1974).

Neben diesem auffälligen morphologischen Merkmal, das bei dem

xylitabbauenden Keim nicht vertreten ist, unterscheiden sich P. vulgaris und P. mirabilis in der Fähigkeit zur H_2S-Bildung und Gelatineverflüssigung (Gelatinase positiv) sowie im Abbau von Mannose.

Die Gattung Providencia mit den beiden Arten P.alcalifaciens und P. stuartii, kann durch Abweichungen in der Citrat-Verwertung, der Ornithindecarboxylierung und der Hydrolyse von Harnstoff, deutlich abgegrenzt werden. Besonders die fehlende Urease-Aktivität markiert den Unterschied zu den "stark Urease bildenden Proteusbakterien" (MERCK 1972).

P. rettgeri zeigt ebenfalls ein abweichendes biochemisches Verhalten in der Citrat-Verwertung und in der Decarboxylierung von Ornithin. Daneben sind die Verwertung von Mannit, Inosit und Glycerin weitere Unterscheidungsmerkmale.

Damit kann der xylitabbauende Stamm RX2 sicher als Proteus morganii identifiziert werden.

4.4 Carakterisierung und Differenzierung des Stammes HX1

4.4.1 Charakterisierung des Stammes HX1

Bezeichnend für diesen Keim sind die relativ kleinen, geraden bis leicht gekrümmten, unbeweglichen Stäbchen mit einer Länge von 1 und einem Durchmesser von etwa 0,3μ, wie aus den elektronenoptischen Aufnahmen (Abb. 2 und 3) hervorgeht. Die Zellpole sind deutlich abgerundet und die Zellen selbst von dünnen Schleimhüllen umgeben. Intrazellulär finden sich Granula an beiden Zellpolen, und bei einigen Keimen ist eine unregelmäßige Quersegmentierung zu erkennen. Weiterhin ist dieser Keim charakterisiert durch die pallisadenförmige Anordnung der Stäbchen zusammen mit abgewinkelt angeordneten Zellen im Stadium der Zellteilung (vgl. Abb. 2 und 3).

Makroskopisch auffällig sind die sehr kleinen Kolonien mit einem Durchmesser von weniger als 1 mm nach 48-stündigem Wachstum auf einem xylithaltigen Festmedium (Bacto Phenol Red Agar Base + 1% Xylit) bei 37 ^{o} C. Auf Standard I-Nähragar (MERCK) und APT-Agar (MERCK) erreichten die Kolonien aufgrund des stärkeren Wachstums einen Durchmesser von annähernd 2 mm.

Sporen und Pigment werden nicht gebildet. Die GRAM-Reaktion des Stammes HX1 ist nicht eindeutig zu bewerten (vgl. 4.4.2). Weitere strukturelle Merkmale dieses Keimes sind in Abschnitt 4.1.1 beschrieben.

Der Keim ist fakultativ anaerob, zeigt aber in Gegenwart von atmosphärischem Sauerstoff ein besseres Wachstum. Er verwertet chemoorganotroph ein breites Spektrum unterschiedlicher Kohlenhydrate, und zwar sämtliche im Test angebotenen Monosaccharide, Oligosaccharide und Polysaccharide, mit Ausnahme von Sorbose und Rhamnose; Fructose wurd nur schwach abgebaut. Die Glykoside -Mehtylglucosid, Salicin und Aesculin werden ebenso verwertet wie der Aminozucker D-Glucosamin und der

dreiwertige Alkohol Glycerin. Ferner werden die Zuckeralkohole Inosit und Adonit, sowie die Saccharose-Austauschstoffe Mannit und Xylit, unter Bildung von Säure abgebaut. Der Abbau von Sorbit und Dulcit ist negativ. Gas wird bei der Fermentation der Kohlenhydrate in keinem Fall gebildet. Der Kohlenhydratstoffwechsel ist heterofermentativ. Wie aus einer Arbeit von ELIAS (1976) hervorgeht, beträgt der Anteil der Milchsäure an der gebildeten Gesamtsäure bei der Verwertung von Saccharose 30%, bei Glucose 19% und bei Xylit 15%.

Die elektrometrisch ermittelten End-pH-Werte erreichten nach 48-stündigem Wachstum der Kulturen in einem flüssigen Nährmedium (Phenol Red Broth Base + 1% Kohlenhydrat) bei 37° C pH 4,55 bei Glucose und lagen bei den anderen C-Quellen im Bereich von pH 4,7 bis 5,1. Fructose wurde nur bis zu einem pH von 5,3 abgebaut.Der End-pH-Wert des Saccharose-Austauschstoffes Xylit lag bei 4,8; ein Wert, der zum Beispiel auch beim Saccharoseabbau erreicht wird.

Im Gegensatz zu diesen ausgeprägten saccharolytischen Fähigkeiten verhält sich der Stamm HX1 in bezug auf weitere Stoffwechselleistungen inert. Wie aus Tabelle 11 hervorgeht, sind neben der (bereits erwähnten) Aesculinhydrolyse lediglich die Nitratreduktion und die Phosphatase-Aktivität positive biochemische Leistungen dieses Keimes. Die Enzyme Katalase und Cytochromoxydase konnten nicht nachgewiesen werden. Da die Fähigkeit zur Bildung dieser Enzyme bei der Differenzierung und Klassifizierung besonders bewertet wird, erfolgte der Nachweis wiederholt und unter jeweils geänderten Voraussetzungen. Dabei ergaben sich stets die gleichen, negativen Ergebnisse. Ebenfalls negativ sind die H_2S-Bildung, die Hydrolyse von Harnstoff (Urease negativ), sowie die Verflüssigung von Gelatine. Acetylmethylcarbinol wird nicht gebildet (VOGES-PROSKAUER-Reaktion negativ). Wird Citrat als alleinige Kohlenstoffquelle angeboten, so kann der Keim nicht wachsen (SIMMONS´-Citrat negativ).

Das auffallend reaktionsträge Verhalten des Stammes HX1 ist weiterhin am Aminosäurestoffwechsel zu erkennen; denn keine der angebotenen Aminosäuren wird metabolisiert. Auch die Bildung von Indol aus Tryptophan ist negativ.

Der Keim ist nicht resistent gegenüber KCN. Ebenso wächst er nicht in 0,01% Methylenblaumilch und in Nährmedien mit einem Zusatz von 0,04% K-Tellurit. Die Kochsalztoleranz liegt bei 4% (kein Wachstum bei 6,5% NaCl). Das Wachstum in Medien mit 10% Galle ist positiv, in Medien mit 40% Galle dagegen schwach. Die besten Wachstumsbedingungen liegen im Bereich zwischen 37° C und 45° C. Die Säurebildung aus Glucose war nach der 48-stündigen Bebrütung bei 45° C (End-pH-Wert 4,33) geringfügig stärker als bei 37° C (End-pH-Wert 4,55). Hämolyse auf Blut-Agar war nicht festzustellen. Der Oxidations-Fermentation-Test nach HUGH and LEIFSON, der in der Bakteriologie sehr häufig als Hauptkriterium bei der Erkennung und Einteilung von Mikroorganismen gewählt wird, führte zu keinem Ergebnis, da der Keim sich in diesem Medium nicht vermehrte. Möglicherweise ist dies auf eine Wachstumshemmung durch Bromthymolblau zurückzuführen; denn nach LEIFSON (1963) ist dieser pH-Indikator für einige Bakterien toxisch.

Um weitere Hinweise über die Taxonomie des Stammes HX1 zu erhalten, wurde sein Wachstum auf verschiedenen Selektivnährmedien überprüft. Die folgende Aufstellung gibt eine Übersicht:

(1) Selektivmedien für Enterobakterien:

MAC CONKEY-Agar	kein Wachstum
Salmonella-Shigella-Agar	kein Wachstum

(2) Selektivmedien für Lactobazillen:

Sorbinsäure-Agar	kein Wachstum
Rogosa-Agar	kein Wachstum

4.4.2 Differenzierung des Stammes HX1

Nach allgemeinen morphologischen und physiologischen Hauptmerkmalen kann dieser Stamm nicht sicher in die Systematik der GRAM-negativen Bakterien eingeordnet werden (vgl. 4.1.3).

Für eine weiterführende Diagnostik ist es daher erforderlich, mögliche Abweichungen oder schwach ausgeprägte Merkmale in der Physiologie und Morphologie besonders zu berücksichtigen, und solche Charakteristika, die größere taxonomische Einheiten differenzieren - wie zum Beispiel die GRAM-Reaktion - kritisch zu beurteilen.

Neben Fehlern bei der Bestimmung der Zellform und Beweglichkeit ist eine falsche Beurteilung der GRAM-Reaktion die häufigste Ursache für Verwechslungen bei der Klassifizierung von Bakterien (BERGEY 1974).

Der Aussagewert der GRAM-Reaktion ist insbesondere abhängig vom Alter der Bakterienkulturen und der Färbemethodik. Es ist bekannt, daß GRAM-positive Bakterien mit zunehmendem Alter der Zellen ihre Fähigkeit zur GRAM-positiven Reaktion verlieren können,so zum Beispiel die Lactobazillen oder die Corynebakterien (COWAN and STEEL 1974). Daneben gibt es Organismen, z.B. Gemella- oder Arthrobacter-Spezies, die nach der GRAM-Methode nicht sicher klassifiziert werden können, da eine positive Reaktion nur schwach ausgeprägt ist und der violette Farbstoff sehr leicht mit den entsprechenden Differenzierungsmitteln entfernt werden kann. Sie erscheinen dann nach der Gegenfärbung im mikroskopischen Präparat GRAM-negativ, obwohl dies nicht der genetisch determinierten Struktur der Bakterienzellwand, dem eigentlichen taxonomischen Kriterium, entspricht.

GRAM-Färbungen des Stammes HX1, die nach 48-stündigem Wachstum der Organismen auf einem xylithaltigen Festmedium (Phenol Red Agar Base + 1% Xylit) angefertigt wurden, waren stets negativ - auch bei schonender Differenzierung mit Äthanol oder Aceton. Nach Vorkultivierung in einem flüssigen Anreicherungsmedium (APT-Bouillon, MERCK) und anschließender Überimpfung auf APT-Agar (MERCK) zeigten die Keime ein stärkeres Wachstum, sodaß bereits nach 36 Stunden GRAM-Präparate von relativ jungen Kolonien angefertigt werden konnten. Dabei waren wiederholt schwach positive Reaktionen zu beobachten, besonders wenn die GRAM-Färbung nach der"HUCKER-Modifikation" (HUCKER and CONN 1923) durchgeführt wurde. Die Retention des Farbstoffes (Kristallviolett) war jedoch in besonderem Maße abhängig von Dauer und Intensität der Differenzierung und von dem verwendeten Lösungsmittel: so waren die präparierten Keime nach kurzer Behandlung mit Aceton (2 bis 3 Sekunden; vgl. COWAN and STEEL 1974) und Gegenfärbung mit Safranin zwar schwach, aber dennoch deutlich mit dem violetten Farbstoff, der die GRAM-positive Reaktion anzeigt, gefärbt. Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei schonender Entfärbung mit 95% Äthanol erzielt werden. Mögliche Artefakte sind bei diesem Vorgehen allerdings nicht ganz auszuschließen, da stets auch zwischen den schwach violett gefärbten Bakterienzellen restliche violette Farbstoffpartikel zu erkennen waren. Nach verstärkter Differenzierung mit Äthanol oder Aceton, bei der auch diese restlichen Partikel entfernt wurden, konnten die Zellen jedoch vollkommen entfärbt werden und erschienen damit GRAM-negativ.

Dennoch kann nach den vorliegenden Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden, daß es sich bei dem Stamm HX1 um GRAM-positive bzw. GRAM-labile Keime handelt; denn eindeutig GRAM-negative Organismen zeigen, bedingt durch den chemischen Aufbau ihrer Zellwand, zu keinem Zeitpunkt ihrer Wachstumsphase eine positive Reaktion, besonders nicht in jungen Kulturen. "Somit hat - wie bei vielen anderen Untersuchungen auch - ein

(schwach) positives Ergebnis" (in diesem Falle die Retention des violetten Farbstoffes) "eine wesentlich größere Bedeutung als ein negatives, welches falsch sein kann (1) bedingt durch das Alter der Kulturen oder (2) durch übertriebene Entfärbung mit starken Lösungsmitteln,wie Aceton"(COWAN and STEEL 1974).

In der folgenden Betrachtung wird zunächst auf die in der bakteriologischen Diagnostik übliche Einordnung der untersuchten Keime in Hauptgruppen nach der GRAM-Methode verzichtet und die nicht eindeutige GRAM-Reaktion bei der Differenzierung als Merkmal von geringerer taxonomischer Bedeutung gewertet. Bei diesem Vorgehen werden die Merkmale des Stammes HX1 mit den Eigenschaften GRAM-negativer und GRAM-positiver Bakterien verglichen und geprüft, mit welchen dieser Organismen der untersuchte Keim am weitesten übereinstimmt.

Ausgehend von grundlegenden strukturellen und funktionellen Charakteristika (Stäbchen, sporenlos, unbeweglich; Wachstum aerob und anaerob; vgl. 4.4.1) kann der Stamm HX1 bereits von der Mehrzahl der GRAM-negativen und GRAM-positiven Organismen abgegrenzt werden.

In Tabelle 10 sind die Keime, die für die weitere Differenzierung und Klassifizierung in Betracht zu ziehen sind -GRAM-negative und GRAM-positive, fakultativ anaerobe, asporogene, unbewegliche Stäbchen- zusammenfassend dargestellt im Vergleich mit den Hauptmerkmalen des Stammes HX1.

Die Fähigkeit zur Bildung der Enzyme Katalase und Cytochromoxidase ist für die Taxonomie GRAM-negativer und GRAM-positiver Bakterien von besonderer Bedeutung und dient der weiteren Unterscheidung der in Tabelle 10 aufgeführten Keime.

Tab. 10: Hauptmerkmale des Stammes HX1 im Vergleich mit den Eigenschaften GRAM-negativer und GRAM-positiver Stäbchen

Tests	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GRAM-Reaktion	+	+	+	-/(+)	-	-	-	-	-	-
Sporen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Beweglichkeit	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-
Wachstum aerob	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Wachstum anaerob	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalase	+	-	-	-	+*	D	+	+	-	-
Oxidase	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Glucose (Säure)	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+

GRAM-positive Stäbchen:

1 Corynebacterium spp.
2 Erysipelothrix spp.
3 Lactobacillus spp.

GRAM-negative Stäbchen:

5 Enterobacteriaceae
6 Haemophilus spp.
7 Pasteurella spp.
9 Cardiobacterium spp.
10 Streptobacillus spp.

4 Stamm HX1 (GRAM-negative bzw. GRAM-labile Stäbchen)

Angaben über Vergleichsorganismen nach BERGEY (1974) und COWAN and STEEL (1974).

Erklärung: + = mehr als 90% der Stämme positiv
- = mehr als 90% der Stämme negativ
D = unterschiedliche Reaktionen bei verschiedenen Vertretern einer Familie oder Gattung
* = Ein Serotyp der Gattung Shigella ist Katalase-negativ

Der Vergleich der Hauptmerkmale des Stammes HX1 mit den Eigenschaften der in Tabelle 10 aufgeführten GRAM-negativen Stäbchen ergibt - abgesehen von den Kriterien, nach denen diese Vergleichorganismen ausgewählt wurden - weitere Übereinstimmungen besonders bei der Gattung Streptobacillus. Dieser Katalase- und Oxidase-negative Keim, von dem bisher nur eine Spezies - Streptobacillus moniliformis - beschrieben ist, unterscheidet sich jedoch grundlegend von dem Stamm HX1 in der Zellmorphologie sowie in den Wachstumsbedingungen. So sind die Stäbchen gedreht und gekrümmt und bilden häufig Ketten oder Filamente mit einer Serie von ovalen bis länglichen Verdickungen (BERGEY 1974). Weiterhin benötigt dieser Organismus für das Wachstum zusätzlich CO_2 sowie Nährmedien, die mit 20% Serum, Ascites-Flüssigkeit oder Blut angereichert sind (COWAN and STEEL 1974).

Ebenfalls sind sämtliche Vertreter der Gattung Haemophilus abhängig von bestimmen Wachstumsfaktoren. Sie gelten als anspruchsvoll und benötigen als strikte Parasiten zu ihrer Vermehrung Wuchsstoffe (V- und X-Faktoren), die in allen menschlichen und tierischen Körpersäften enthalten sind. Der V-Faktor entspricht dem Koenzym I; der X-Faktor ist identisch mit Hämin (WIESMANN 1978). Insgesamt können diese besonderen Wachstumsbedingungen, zusammen mit der bei der Mehrzahl der Spezies positiven Katalase-Reaktion, als ausreichend für eine Abgrenzung der Haemophilus-Arten von dem Stamm HX1 angesehen werden.

Die Vertreter der Gattungen Pasteurella und Actinobacillus unterscheiden sich von dem Stamm HX1 durch den positiven Katalase- und Oxidase-Test. Weitere Unterscheidungsmerkmale der Actinobacillus-Arten sind die Hydrolyse von Harnstoff (Urease positiv) sowie das Wachstum auf MAC CONKEY-Agar. Die für Pasteurella typischen, bipolar färbbaren, ovoiden Zellen verdeutlichen als strukturelles Merkmal die biochemische Differenzierung dieser Spezies von dem untersuchten Keim.

Die Gattung Cardiobacterium wurde von SLOTNICK and DOUGHERTY (1964, 1965) nach einer Untersuchung von nur wenigen Stämmen beschrieben. Der einzige Gattungsvertreter - Cardiobacterium hominis - zeigt in der Zell- und Koloniemorphologie weitgehende Übereinstimmung mit dem Stamm HX1. Auch die GRAM-Reaktion ist vergleichbar mit den Ergebnissen, die bei GRAM-Färbungen des Stammes HX1 erzielt wurden (vgl. 4.4.2). Dieser Organismus hat ebenso die Tendenz bei der Entfärbung einen Teil des Farstoffes (Kristallviolett) in verschiedenen Teilen der Zelle zurückzuhalten (BERGEY 1974, LENNETTE et al. 1974) und erscheint dann GRAM-negativ mit GRAM-positiven Bereichen (COWAN and STEEL 1974).
Eine hohe Similarität besteht ferner in wesentlichen funktionellen Merkmalen: unter anderem im Aminosäurestoffwechsel und bei verschiedenen Resistenzeigenschaften. Daneben muß jedoch die Fähigkeit zur Bildung des Enzyms Cytochromoxidase als grundlegender Unterschied zum Reaktiosverhalten des Stammes HX1 gewertet werden. Ebenso sind die saccharolytischen Fähigkeiten von Cardiobacterium hominis nur schwach ausgeprägt, sodaß insgesamt die taxonomische Einordnung des Stammes HX1 in diese Spezies nicht gerechtfertigt erscheint.
Das biochemische Leistungsspektrum von Cardiobacterium hominis ist im Vergleich mit den Merkmalen des Stammes HX1 in Tabelle 11 dargestellt.

Die positive Katalase-Reaktion ist ebenso wie das Wachstum auf MAC CONKEY-Agar ein gemeinsames Merkmal der Enterobacteriaceen und unterscheidet die Vertreter dieser Bakterienfamilie von dem Stamm HX1. Als Ausnahme in bezug auf die Katalase-Reaktion sind innerhalb der Gattung Shigella Katalase-negative Serotypen bekannt: so besonders Shigella dysenteriae Serotyp 1; unter anderen Shigellen werden gelegentlich Katalase-negative Stämme gefunden, besonders bei Shigella flexneri Serotyp 4a (CARPENTER and LACHOWICZ 1959). Das Reaktionsmuster des Stammes HX1 zeigt -mit Ausnahme der fermentativen Eigenschaften (Abbau von Lactose)- einen hohen

Grad an Übereinstimmung mit den Merkmalen dieser Serotypen (vgl. Tab. 11). Dennoch kann der untersuchte Keim nicht als Shigella klassifiziert werden, da das Wachstum der Kulturen auf SS-Agar (MERCK), einem Selektivmedium zur Isolierung von Salmonellen und Shigellen, gehemmt wurde. Auch die Unterdrückung des Wachstums auf MAC CONKEY-Agar spricht gegen Shigella und gegen die Einordnung des Stammes HX1 in die Systematik der Enterobacteriaceen.

Der Vergleich des GRAM-negativen bzw. GRAM-labilen Stammes HX1 -der nur in jungen Kulturen eine schwach GRAM-positive Reaktion zeigt (vgl. 4.4.2)- mit den GRAM-positiven Organismen in Tabelle 10 ist dadurch begründet, daß sowohl Lactobazillen als auch Erysipelothrix und Corynebakterien mit zunehmendem Alter und Azidität der Kulturen ihre Fähigkeit zur Retention des violetten Farbstoffes verlieren können und dadurch GRAM-negativ erscheinen (vgl. BERGEY 1974).

Die Gattung Erysipelothrix ist ebenso wie der Stamm HX1 Katalase- und Oxidase-negativ . Erysipelothrix rhusiopathiae, der einzige Vertreter dieser Gattung, läßt jedoch in weiteren funktionellen Merkmalen deutliche Abweichungen vom Reaktionsspektrum des Stammes HX1 erkennen. Neben der fehlenden Aesculin-Hydrolyse, der negativen Nitratreduktion und der Bildung von Schwefelwasserstoff, differenzieren vor allem die Alpha-Hämolyse und die Resistenz gegenüber 0,5% K-Tellurit diese GRAM-positive Spezies von dem Stamm HX1. Die Gegenüberstellung der Merkmale ist Tabelle 11 zu entnehmen.

Der Stamm HX1 zeigt im Vergleich mit den Merkmalen der Gattung Lactobacillus, neben Übereinstimmungen in der Katalase- und Oxidase-Reaktion, ähnliche saccharolytische Fähigkeiten sowie eine auffällige Thermotoleranz (Wachstum bei 45° C), die auch für die Mehrzahl der Lactobacillus-Arten typisch ist. Als strukturelles Merkmal sind die bipolaren Granula in den Zellen des untersuchten Keimes zu beobachten (vgl. Abb. 2

und 3), die auch bei einigen Lactobacillus-Stämmen gefunden werden (BERGEY 1974). Obwohl aufgrund des physiologischen Gesamtbildes nicht ausgeschlossen werden kann, daß es sich bei dem Stamm HX1 um einen Vertreter der Lactobacillen handelt, spricht gegen diese Klassifizierung, daß der Keim auf Rogosa- und Sorbinsäure-Agar (MERCK), Selektivmedien zur Isolierung von Lactobacillen, kein Wachstum zeigte.

Bei der diagnostischen Betrachtung der Corynebakterien wird zunächst deutlich, daß diese Organismen weitgehend mit der Morphologie des Stammes HX1 übereinstimmen: die Stäbchen sind von unregelmäßiger Form, meistens gerade bis leicht gekrümmt und weisen häufig endständige, keulenartige ("coryneforme") Verdickungen auf. Metachromatische Granula, die intrazellulär unregelmäßig verteilt sind, erscheinen oft an den Zellpolen als sogenannte Polkörperchen (LENNETTE et al. 1974, WIESMANN 1978). Diese für Corynebakterien typischen strukturellen Merkmale sind in ähnlicher Form auch bei den Zellen des Stammes HX1 vertreten (vgl. Abb. 2 und 3). Ein weiteres Kriterium zur Erkennung der Corynebakterien ist die charakteristische Anordnung der Bakterienzellen. Bedingt durch die Art der Zellteilung ("snapping division") "winkeln sich die Zellen infolge verschieden schnellen Aufreißens der Wandverbindung zu beiden Seiten der neuen Zellwand gegeneinander ab" (SCHLEGEL 1969). Dadurch entstehen pallisadenförmige Zellaggregate, die an "Chinesische Schriftzeichen" erinnern (BERGEY,1974, LENNETTE et al. 1974). Ein entsprechendes Erscheinungsbild kann ebenfalls bei dem Stamm HX1 beobachtet werden und ist besonders deutlich auf der elektronenoptischen Aufnahme (Abb. 2) zu erkennen. Damit steht der Stamm HX1 morphologisch den Corynebakterien am nächsten.

Abweichend von der Physiologie dieses Keimes besitzen jedoch sämtliche Vertreter der Gattung Corynebacterium, mit Ausnahme von C. phocae, die Fähigkeit das Enzym Katalase zu bilden. Ebenso ist bei der Differenzierung zu beachten, daß Kalium-

Tellurit-Medien selektiv auf Corynebakterien wirken. Sie finden Verwendung bei der Isolierung und Kultivierung dieser Organismen (LENNETTE et al. 1974, WIESMANN 1978). Da das Wachstum des Stammes HX1 auf Nährböden mit einem Zusatz von (0,04%) Kalium-Tellurit gehemmt wird (vgl. 4.4.1),kann dieser Keim unter Berücksichtigung der Katalase-Reaktion nicht in die Systematik der Corynebakterien eingeordnet werden.

Corynebacterium phocae ist ein Katalase-negativer, coryneformer Organismus, der nicht auf Nährböden wächst die Kalium-Tellurit enthalten (BERGEY 1974). Aufgrund dieser fehlenden Resistenzeigenschaften gehört er nach BERGEY (1974) nicht der Gruppe der Corynebakterien an. Dieser Keim, der aus einem Seehund-Erysipel isoliert wurde (SVENKERUD, ROSTED und THORSAUG 1951), zeigt neben Übereinstimmungen mit dem Wachstumsverhalten und der Koloniemorphologie des Stammes HX1 ein ähnliches biochemisches Reaktionsspektrum. Wie Tabelle 11 zu entnehmen ist, werden Urease und Indol nicht gebildet. Citrat als alleinige Kohlenstoffquelle wird nicht verwertet und Gelatine nicht verflüssigt. Weiterhin gleichen die Hydrolyse der Glykoside Aesculin, Salicin und α-Methylglucosid, sowie die fermentativen Eigenschaften den entsprechenden Merkmalen des Stammes HX1. Abweichungen sind lediglich bei der Bildung von Acetylmethylcarbinol (VOGES-PROSKAUER-Reaktion) und der Nitratreduktion festzustellen.

Damit würde, unter Berücksichtigung der bereits erwähnten labilen GRAM-Reaktion (vgl. 4.4.2), der xylitabbauende Stamm HX1 Corynebacterium phocae taxonomisch am nächsten stehen. Da aber in der Literatur keine weiteren und für eine sichere Identifizierung ausreichende Angaben über C. phocae gefunden werden konnten, wäre es für eine endgültige Klassifizierung des Stammes HX1 als Vertreter dieser Spezies erforderlich, den xylitabbauenden Keim im direkten Vergleich mit dem Referenzstamm zu testen, um weitere Hinweise über das biochemische Leistungsspektrum von C. phocae, insbesondere auch über einen möglichen Abbau von Xylit, zu erhalten.

Insgesamt kann aber der Stamm HX1 nach den vorliegenden Ergebnissen nicht in die bisher bekannte Bakteriensystematik eingeordnet werden; auch nicht unter besonderer Berücksichtigung der GRAM-Reaktion und nach kritischem Vergleich der morphologischen und physiologischen Merkmale des untersuchten Keimes mit den Eigenschaften von sämtlichen in Betracht kommenden GRAM-positiven und GRAM-negativen Organismen.

Für eine weiterführende Differenzierung und systematische Einordnung dieses xylitabbauenden Keimes wäre es notwendig, die Produkte des Kohlenhydratstoffwechsels, den Gehalt der DNA an Guanin und Cytosin sowie die Struktur der Bakterienzellwand chemisch zu bestimmen.

Tab. 11: Identifizierungs- und Differenzierungsmerkmale des Stammes HX1 im Vergleich mit den Eigenschaften GRAM-positiver und GRAM-negativer Stäbchen

Tests	1	2	3	4	5	6	7	8
H_2S-Bildung	-	-	+	-	-	-	(+)	-
Urease (Christensen)	-	-	-	-	-	-	-	-
Indolbildung	-	-	-	-	-	d	+	-
Voges-Proskauer-Test	+	-	-	-	-	-	-	.
Citrat (Simmons')	-	.	.	-	-	-	-	.
KCN-Resistenz	.	.	.	-	-	-	-	.
K-Tellurit-Resistenz	-	+	+	-	.	.	-	.
Gelatinase	-	+	-	-	-	-	-	-
Aesculin (Hydrolyse)	+	.	-	+	-	-	-	+
Lysindecarboxylase	.	.	.	-	-	-	-	.
Arginindihydrolase	.	.	+	-	-	-	-	+
Ornithindecarboxylase	.	.	.	-	-	-	-	.
Phenylalanindesaminase	.	.	.	-	-	-	-	-
Nitratreduktion	-	-	-	+	+	+	-	-
Phosphatase	.	.	.	+	.	.	.	+
Katalase	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase	-	-	-	-	-	-	+	-
Mac Conkey (Wachstum)	-	-	-	-	+	+	-	-
GRAM-Reaktion	+	+	+	-/(+)	-	-	-	-

1 Corynebacterium phocae
2 Corynebacterium pyogenes
3 Erysipelothrix rhusiopathiae
4 Xylit abbauender Stamm HX1
5 Shigella dysent. Serotyp 1
6 Shigella flexneri Serotyp 4a
7 Cardiobacterium hominis
8 Streptobacillus moniliformis

Angaben über Vergleichsorganismen nach BERGEY (1974), COWAN and STEEL (1974), LENNETTE et al. (1974).

Tab. 11: (Fortsetzung) Verwertung verschiedener C-Quellen

Tests	1	2	3	4	5	6	7	8
L(+) Arabinose	.	–	+	+	–	+	–	d
D(+) Ribose	.	.	.	+	.	.	.	.
D(+) Xylose	.	+	+	+	–	–	–	d
D(+) Galactose	.	+	+	+	.	.	–	+
D(+) Glucose	+	+	+	+	+	.	+	+
D(+) Mannose	.	.	.	+	.	.	+	+
D(–) Fructose	+	+	+	(+)	.	.	+	+
L(–) Sorbose	.	.	.	–	.	.	.	.
L(+) Rhamnose	.	–	–	–	–	–	–	–
Saccharose	+	–	–	+	–	–	+	d
Maltose	+	+	–	+	–	d	+	+
Lactose	.	+	+	+	–	–	–	d
Trehalose	+	–	–	+	+	d	–	–
Melibiose	.	.	+	+	.	.	–	.
Cellobiose	.	.	.	+	.	.	–	.
Raffinose	.	–	–	+	.	.	.	–
Inulin	.	.	–	+	.	.	.	–
Mannit	.	–	–	+	–	+	d	–
Sorbit	.	–	–	–	–	d	+	–
Dulcit	.	–	.	–	–	–	–	–
Xylit	.	.	.	+	.	.	.	.
Adonit	.	.	.	+	–	–	–	.
meso-Inosit	.	–	–	+	.	.	–	–
Glycerin	.	–	–	+	.	.	–	–
D-Glucosamin	.	.	.	+	.	.	.	.
α-Methylglucosid	+	.	.	+	.	.	.	.
Salicin	+	–	–	+	–	–	.	d

1 Corynebacterium phocae
2 Corynebacterium pyogenes
3 Erysipelothrix rhusiopathiae
4 Xylit abbauender Stamm HX1
5 Shigella dysent. Serotyp 1
6 Shigella flexneri Serotyp 4a
7 Cardiobacterium hominis
8 Streptobacillus moniliformis

Angaben über Vergleichsorganismen nach BERGEY (1974), COWAN and STEEL (1974), LENNETTE et al. (1974).

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die von GEHRING aus Plaque-Proben der Versuchstiere Ratte und Hamster (GEHRING 1974) sowie die im Rahmen der Turku-Zuckerstudien aus menschlicher Zahnplaque isolierten, xylitabbauenden Keime (GEHRING et al. 1975) bakteriologisch untersucht und in Anlehnung an die bekannten Handbücher der Bakteriologie klassifiziert.

Von den insgesamt 26 Xylit-positiven Keimen konnten zunächst 24 Stämme als Streptokokken und 2 weitere Stämme als GRAM-negative Stäbchen beschrieben werden.

Die weitgehende Übereinstimmung im biochemischen Leistungsspektrum der Streptokokken erlaubte eine Einteilung der Stämme in fünf Biotypen mit jeweils gleichen Merkmalsgruppen. Bei diesen Keimen handelt es sich ausnahmslos um Enterokokken mit den von SHERMAN (1938) beschriebenen charakteristischen Resistenzeigenschaften.
Im einzelnen konnten 23 der Streptokokkenstämme als Streptococcus avium und 1 Stamm als Streptococcus bovis nahestehende Art klassifiziert werden. Die Keime waren serologisch nicht in die bekannten LANCEFIELD-Streptokokken-Gruppen A bis S einzuordnen.

Der GRAM-negative, xylitabbauende Stamm RX2 konnte in die Familie der Enterobacteriaceen eingeordnet und als Proteus morganii klassifiziert werden.

Die Identifizierung des Stammes HX1 war nicht möglich, nicht zuletzt aufgrund einer variablen GRAM-Reaktion. Selbst nach kritischem Vergleich der morphologischen und physiologischen Merkmale dieses Keimes mit den Eigenschaften von sämtlichen in Betracht kommenden Organismen, konnte der Stamm HX1 nicht in die bisher bekannte Bakteriensystematik eingeordnet werden.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. F. G e h r i n g für die freundliche Überlassung des Themas, die Übernahme des Referates und insbesondere für die stets bereitwillige Unterstützung bei der Durchführung und Abfassung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. R. N a u j o k s möchte ich für die Übernahme des Korreferates danken.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau U. R u m m e l , Frau R. S c h m i d und Frau A. E l i a s danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten.

6. LITERATURVERZEICHNIS

BÄSSLER,K.H., STEIN,G. und BELZER,W.:
Xylitstoffwechsel und Xylitresorption.
Biochem. Z. 346, 171-185 (1966)

BÄSSLER,K.H.:
Biochemie und Stoffwechsel von Zuckeraustauschstoffen.
Dtsch. zahnärztl. Z. 32, 25-31 (1977)

BAILEY,L. and SCOTT,J.:
Diagnostic Microbiology.
The C.V. Mosby Comp., Saint Louis (1970)

BERGEY,D.H.:
Manual of Determinative Bacteriology.
The Williams ans Wilkins Comp., Baltimore
Eight Edition (1974)

BINDER,K.:
International Documentation-Center for Preventive Dentistry in Wien gegründet.
Kariesprophylaxe 1, 35-36 (1979)

BÖSSMANN,K.:
Bildung, Zusammensetzung und Stoffwechsel der Plaque und ihre ätiologische Bedeutung für die Entstehung von Karies.
Kariesprophylaxe 1, 3-14 (1979)

BRAMSTEDT,F. und Mitarbeiter BÜTTNER,W., KARLE,E., TRAUTNER,K. und GEHRING,F.:
Die Bedeutung von Zuckeraustauschstoffen und Zuckerersatzstoffen in der Ernährung und in der Kariesätiologie. Symposium in Würzburg.
Dtsch. zahnärztl. Z. 26, 1017-1192 (1971)

BRAMSTEDT,F. und TRAUTNER,K.:
Zuckeraustauschstoffe und Biochemie der Zahnplaques
Dtsch. zahnärztl Z. 26, 1135-1144 (1971)

BRAMSTEDT,F.:
Zuckeraustauschstoffe in der Kariesprophylaxe.
Med. Klin. 70, 1858-1866 (1975)

CARLSSON,J.:
Presence of various types of non-haemolytic streptococci in dental plaque and in other sites of the oral cavity in man.
Odont. Revy 18, 55-74 (1967)

CARLSSON,J.:
A numerical taxonomic study of human oral streptococci.
Odont. Revy 19, 137-160 (1968)

CARPENTER,K.P. and LACHOWICZ,K.:
The catalase activity of Shigella flexneri.
J. Path. Bact. 77, 645 (1959)

COLMAN,G. and WILLIAMS,R.E.O.:
Taxonomy of some human viridans streptococci.
In: Streptococci and Streptococcal Diseases
(Edited by WANNAMAKER,L.W. and MATSEN,J.H.),
Chap. 17 pp. 281-299
Academic Press, London (1972)

COLMAN,G. and WILLIAMS,R.E.O.:
Identification of human streptococci.
In: Recent Advances in Clinical Pathology
(Edited by DYKE), Chap. 16 pp. 293-303
Churchill/Livingstone, London (1973)

COSTIN,J.D.:
Die biochemische Identifizierung der Enterobacteriaceae - kritische Bemerkungen zu Prinzipien und Methoden.
Zbl. Bakt. I. Ref. 219, 81-151 (1969)

COSTIN,J.D.:
Orientierende Identifizierung obligat- und fakultativ-aerober, anspruchsloser, gramnegativer Stäbchen von medizinischem Interesse.
Med. Labor Bd. 30, Heft 8, 197-217 (1977)

COWAN,S.T. and STEEL,K.J.:
Manual for the Identification of Medical Bacteria.
Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, Melbourne, Second Edition (1974)

CREMER,H.D.:
Ernährungsphysiologische Aspekte zum Konsum von Zucker und Zuckeraustauschstoffen.
Dtsch. zahnärztl. Z. 26, 1041-1055 (1971)

DALLMEIER,E., BESTMANN,H.-J. und KRÖNCKE,A.:
Über den Abbau von Glukose und Sorbit durch Plaquestreptokokken.
Dtsch. zahnärztl. Z. 25, 887-889 (1970)

DEIBEL,R.H., LAKE,D.E. and NIVEN,C.F.:
Physiology of the enterococci as relatet to their taxonomy.
J. Bacteriol. 86, 1275-1282 (1963)

DEIBEL,R.H.:
The group D streptococci.
Bacteriol. Rev. 28, 330-366 (1964)

DENT,V.E., HARDIE,J.M. and BOWDEN,G.H.:
Streptococci isolatet from dental plaque of animals.
J. Appl Bacteriol. 44, 249-258 (1978)

EDWARDS,P.R. and EWING,W.H.:
Identification of Enterobacteriaceae.
Burgess Publishing Co., Minneapolis, Second Edition (1974)

EDWARDSSON,S.:
Characteristics of caries-inducing human Streptococci resembling Streptococcus mutans.
Archs. oral Biol. 13, 637-646 (1968)

ELIAS,N.:
Vergleichende Untersuchungen über das Säurebildungsvermögen von Xylit abbauenden Plaque-Bakterien in verschiedenen Nährmedien.
Med. Diss., Würzburg (1976)

EWING,W.H.:
The tribe Proteae: its nomenclature and taxonomy.
Int. Bull. Bacterio. Nomencl. Taxon. 12, 93-102 (1962)

FACKLAM,R.R.:
Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests.
Appl. Microbiol. 23, No. 6, 1131-1139 (1972)

FROSTELL,G.:
Kariesgefahr bei Saccharose-Ersatz?
Kariesprophylaxe 1, 25-34 (1979)

GEHRING,F.:
Zum Sorbitabbau durch Streptokokken unter besonderer Berücksichtigung der Mundflora.
Dtsch. zahnärztl. Z. 23, 810-819 (1968)

GEHRING,F.:
Saccharose und Zuckeraustauschstoffe im mikrobiologischen Test.
Dtsch. zahnärztl. Z. 26, 1162-1171 (1971)

GEHRING,F.:
Untersuchungen über die Streptokokken-Flora der Zahnplaques und ihre Beziehung zur Zahnkaries.
Bericht des SFB 92 "Biologie der Mundhöhle", Teilprojekt 1.4, 44-51. Universität Würzburg (1973)

GEHRING,F.:
Mikrobiologische Aspekte zur Kariogenität von Zuckern und Zuckeraustauschstoffen.
Deutsch. zahnärztl. Z. 29, 769-771 (1974)

GEHRING,F. und PATZ,J.:
Über sorbitabbauende Mikroorganismen aus der Mundhöhle des Menschen.
Dtsch. zahnärztl. Z. 29, 1026-1029 (1974)

GEHRING,F., MÄKINEN,K.K., LARMAS,M. and SCHEININ,A.:
Turku Sugar Studies. Occurence of polysaccharide-forming streptococci and ability of the mixed plaque microbiota to ferment various carbohydrates.
Acta odont. Scand. Suppl. 70, (1975)

GEHRING,F. und KARLE,E.J.:
Der Zuckeraustauschstoff Xylit und seine Bedeutung in der Kariesprophylaxe.
Süßwaren 19, 330-340 (1975)

GEHRING,F.:
Turku Sugar Studies.
Bericht des SFB 92 "Biologie der Mundhöhle", Teilprojekt A 5, 35-52,
Universität Würzburg (1976b)

GEHRING,F.:
Mikrobiologische Untersuchungen im Rahmen der "Turku sugar studies".
Dtsch. zahnärztl. Z. 32, 84-88 (1977)

GEHRING,F. und GÜLZOW,H.-J.:
Beitrag zum mikrobiellen Xylitabbau.
Dtsch. zahnärztl. Z. 32, 580-582 (1977)

GEHRING,F.:
Mikrobiologie der Zahnplaques und ihre Bedeutung für die Zahnkaries.
Bericht des SFB 92 "Biologie der Mundhöhle", Teilprojekt A 4, 19-42,
Universität Würzburg (1978)

GEHRING,F.:
Saccharose-Austauschstoffe und ihre Bedeutung für die Kariesprophylaxe, unter besonderer Berücksichtigung mikrobiologischer Aspekte.
Kariesprophylaxe 1, 77-96 (1979)

GIBBS,S.P. and SKINNER,F.A.:
Identification Methods for Microbiologists.
Academic Press, London/New York (1966)

GÜLZOW,H.-J.:
Vergleichende Untersuchungen über den Abbau von Xylit im menschlichen Speichel.
Dtsch. zahnärztl. Z. 29, 772-775 (1974)

GÜLZOW,H.-J.:
Über das Stoffwechselverhalten der menschlichen Plaqueflora gegenüber dem Zuckeraustauschstoff Xylit.
Dtsch. zahnärztl. Z. 32, 744-746 (1977)

GUGGENHEIM,B.:
Extrazellular polysaccharides and microbial plaque.
Internat. dent. J. 20, 657-678 (1979)

GUGGENHEIM,B.:
Streptococci of dental plaques.
Caries Research 2, 147-163 (1968)

HAHN,G., HEESCHEN,W. und TOLLE,A.:
Streptococcus. Eine Studie zur Struktur, Biochemie, Kultur und Klassifizierung.
Sonderdruck aus: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 22, 333
Verlag Th. Mann OHG Hildesheim (1970)

HARDIE,J.M. and BOWDEN,G.H.:
The normal microbial flora of the mouth.
In: SKINNER,F.A. and CARR,J.G.:
The normal microbial flora of man. 47-83
Academic Press, London/NewYork (1974)

HARRIGAN,W.F. and MAC CANCE,M.E.:
Laboratory Methods in Microbiology.
Academic Press, London/New York (1966)

HARTMAN,P.A., REINBOLD,G.W. and SARASWAT,D.S.:
Indicator organisms - a review. I. Taxonomy of the fecal streptococci.
Int. J. Syst. Bacteriol. 16, 197-221 (1966)

JAWETZ,E., MELNICK,J.L. und ADELBERG,E.A.:
Die normale Bakterienflora des menschlichen Organismus.
Med. Mikrobiol., 2. Aufl., 382-384 (1968)

KAMMERER,F.X.:
Xylit - der moderne Zuckeraustauschstoff.
Süßwaren 15, 887-890 (1971)

KAMMERER,F.X.:
Lebensmitteltechnologische Möglichkeiten bei der Verwendung von Xylit.
Süßwaren 16, 22-25 (1972a)

KARLE,E.J. und GEHRING,F.:
Wirkung der Zuckeraustauschstoffe Fruktose, Sorbit und Xylit auf Kariesbefall und Plaqueflora der Ratte.
Dtsch. zahnärztl. Z. 30, 356-363 (1975)

KARLE,E.J. und GEHRING,F.:
Zur Kariogenität xylitabbauender Keime im gnotobiotischen Tierversuch.
Dtsch. zahnärztl. Z. 31, 22-25 (1976)

KARLE,E.J. und GEHRING,F.:
Die Kariogenität von Xylit im Tierversuch.
Dtsch. zahnärztl. Z. 32, Suppl. 1, 89-95 (1977)

KARLSON,P.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1974)

KNUUTTILA,M.L.E.: and MÄKINEN,K.K.:
The effect of xylitol on the growth and metabolism of Streptococcus mutans.
Caries Research 9, 177-189 (1975)

KÖNIG,K.G.:
Karies und Kariesprophylaxe.
Wilhelm Goldmann Verlag, München (1971)

KRASSE,B., JORDAN,H.V., EDWARDSSON,S., SVENSON,I. and TRELL,L.:
The occurence of certain caries inducing streptococci in human dental plaque material.
Arch. Oral Biol. 13, 911-918 (1968)

LARMAS,M., MÄKINEN,K.K. and SCHEININ,A.:
Turku Sugar Studies III. An intermediate report on the effect of sucrose, fructose and xylitol diets on the numbers of salivary lactobacilli, candida and streptococci.
Acta Odont. Scand. 32, 423-433 (1974)

LENNETTE,E.H., SPAULDING,E.H. and TRUANT,J.P.:
Manual of Clinical Microbiology.
American Society for Microbiology
Washington, D.C. (1974)

MAC FADDIN,J.F.:
Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria.
The Williams and Wilkins Comp., Baltimore (1976)

MÄKINEN,K.K.:
The role of sucrose and other sugars in the development of dental caries. A review.
Int. dent. J. 22, 363-386 (1972)

MÄKINEN,K.K. and SCHEININ,A.:
The effect of various sugars and sugar mixtures on the activity and formation of enzymes of dental plaque and oral fluid.
Acta Odont. Scand 30, 259-275 (1972)

MÄKINEN,K.K. and SCHEININ,A.:
The effect of the consumption of various sugars on the activity of plaque and salivary Enzymes.
Int. dent. J. 21, 331-339 (1974)

MÄKINEN,K.K. and SCHEININ,A.:
Turku Sugar Studies II. Preliminary biochemical and general findings.
Acta Odont. Scand. 32, 413-421 (1974)

MARTHALER,Th.:
Epidemiological and clinical dental findings in relation to intake of carbohydrates.
Caries Research 1, 222 (1967)

MARTHALER,Th.:
Kariesprophylaxe in ihrer aktuellen Bedeutung.
Kariesprophylaxe 1, 15-23 (1979)

MEJARE,B. and EDWARDSSON,S.:
Streptococcus milleri (GUTHOF): An indigenous organism of the human oral cavity.
Arch. Oral Biol. 20, 757-762 (1975)

MERCK:
Mikrobiologisches Handbuch
Darmstadt (1972)

MÜHLEMANN,H.R.:
Zuckerfreie, zahnschonende und nichtkariogene Bonbons und Süßigkeiten.
Schweiz. Mschr. Zahnheilk. 79, 117-145 (1969)

MÜHLEMANN,H.R., REGOLATI,B. and MARTHALER,Th.:
The effect on rat fissure caries of xylitol and sorbitol.
Helvet. Odont. Acta 14, 48-50 (1970)

MÜHLEMANN,H.R., RATEITSCHAK,K.H. und RENGGLI,H.H.:
Parodontologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1975)

NEUMEISTER,H.:
Gesundheitserziehung und zahnmedizinische Prophylaxe als Leistung der gesetzlichen Krankenversicherung?
Kariesprophylaxe 1, 36-38 (1979)

NEWBRUN,E.:
Sucrose, the arch criminal of dental caries.
Odont. Revy 18, 373-386 (1967)

NEWBRUN,E.:
Sugar, sugar substitutes and noncaloric sweetening agents.
Int. dent J. 23, 328-345 (1973)

NOWLAN,S.S. and DEIBEL,R.H.:
Group Q streptococci. I. Ecology, serology, physiology and relationships to established enterococci.
J. Bact. 93, 291 (1967)

PLECEAS,P.:
Die Diagnostik der D Streptokokken.
Zentralbl. Bakt. I. Abt. Orig. 214, 130-143 (1970)

RANKE,E. und RANKE,B.:
Zur Bedeutung verschiedener Plaque-Streptokokken für die Karies.
Dtsch. zahnärztl. Z. 25, 270-273 (1970)

RANKE,E. und RANKE,B.:
Untersuchungen zur Kariogenität extrazelluläre Polysaccharide bildender Streptokokken aus menschlicher Zahnplaque.
Dtsch. zahnärztl. Z. 26, 29 (1971)

RANKE,B., RANKE,E. und HAHN,G.:
Kariogenität von Streptokokken ein gelöstes Problem?
Dtsch. zahnärztl. Z. 29, 795-797 (1974)

RÖLLA,G.:
Plaque-Bildung und Plaque-Verhinderung.
Dtsch. zahnärztl. Z. 31, 840-842 (1976)

ROGERS,A.H.:
The proportional distribution and characteristics of streptococci in human dental plaque.
Caries Research 3, 238-248 (1969)

RUSTIGIAN,R. and STUART,C.A.:
The biochemical and serological relationships of the organisms of the genus Proteus.
J. Bact. 49, 419 (1945)

SAUERWEIN,E.:
Kariologie. Kurzgefaßte Histologie und Histopathologie des Zahnes.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1974)

SCHEININ,A. and MÄKINEN,K.K.:
The effect of various sugars and sugar mixtures on dental plaque.
Acta Odont. Scand. 30, 235-257 (1972)

SCHEININ,A., MÄKINEN,K.K. and YLITALO,K.:
Turku Sugar Studies I. An intermediate report on the effect of sucrose, fructose and xylitol diets on the caries incidence in man.
Acta Odont. Scand. 32, 383-412 (1974)

SCHEININ,A. und MÄKINEN,K.K.:
Turku Zuckerstudien.
Dtsch. zahnärztl. Z. 32, Suppl. 1, 76-83 (1977)

SCHLEGEL,H.G.:
Allgemeine Mikrobiologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1972)

SHAW,C. and CLARKE,P.H.:
Biochemical classification of Proteus and Providence cultures.
J. Gen. Microbio. 13, 155-161 (1955)

SHERMAN,J.M.:
The enterococci and relatet streptococci.
J. Bacteriol. 35, 81 (1938)

SKINNER,F.A. and CARR,J.G.:
The normal microbial flora of man.
Academic Press, London/NewYork (1974)

SMITH,D.G. and SHATTOCK,P.M.F.:
The cellular location of antigens in streptococci of groups D, M and Q.
J. Gen. Microbiol. 34, (1) 165-175 (1964)

WIESMANN,E.:
Medizinische Mikrobiologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1978)

L E B E N S L A U F

27. Februar	1950	geboren als Sohn des Ehepaares Willi und Maria H i n k e l , geb. Schimo in Dieburg
April	1956	Eintritt in die Volksschule in Eppertshausen
April	1960	Eintritt in das Goethe-Gymnasium in Dieburg
10. Juni	1969	Reifeprüfung am Goethe-Gymnasium in Dieburg
April	1970	Studium der Biologie an der Technischen Hochschule Darmstadt
11. April	1973	Diplom-Vorprüfung in Biologie an der Technischen Hochschule Darmstadt
April	1973	Studium der Zahnmedizin an der Universität Würzburg
09. August	1978	Bestallung als Zahnarzt
September	1978	Assistenzzahnarzt in freier Praxis
06. Juni	1979	Grundwehrdienst bei der Bundeswehr als Zahnarzt
September	1980	Assistenzzahnarzt in freier Praxis

M u r n a u , 30. April 1981

Günter Hinkel

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80